

Mikroaaltouunin soveltuvuus fiksaatioon ja kudosprosessointiin sekä J.F.C-reagenssin sopivuus fiksaatioaineeksi mikroaaltouunimenetelmässä

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
30.5.2007

Jenni Pitkähalme
Leni Sappinen
Anne Savelius-Lipponen

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto
Bioanalytiikan koulutusohjelma		
Tekijä/Tekijät		
Jenni Pitkähalme, Leni Sappinen ja Anne Savelius-Lipponen		
Työn nimi		
Mikroaaltouunin soveltuvuus fiksaatioon ja kudosprosessointiin sekä J.F.C-reagenssin sopivuus fiksaatioaineeksi mikroaaltouunimenetelmässä		
Työn laji	Aika	Sivumäärä
Opinnäytetyö	Kevät 2007	32 + 5
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Vastauksen saaminen patologian laboratoriosta kestää jopa viikkoja, joten histologisten näytteiden käsittelyprosessia on tarpeen kehittää nopeammaksi. Työskentely patologian laboratoriossa automatisoituu koko ajan ja laitteiden valmistajilla on kaupallisia reagensseja, joita voisi mahdollisesti käyttää myös fiksaatioaineina.</p> <p>Tässä työssä tutkimme, voisiko sekä fiksaation että kuduskäsittelyn suorittaa mikroaaltouunilla, jolloin näytteen käsittely nopeutuisi huomattavasti. Kokeilimme myös kaupallisen J.F.C-reagenssin toimivuutta fiksaatioaineena. Tarkastelun kohteena olivat morfologian säilyminen hematoksyliini-eosiini -värjäyksen perusteella arvioituna sekä immunohistokemiallisten värjäysten toimivuus. Arvioimme myös vaikuttaako erilainen käsittelytapa kudoksen leikkautuvuuteen mikrotomilla.</p> <p>Tutkimus suoritettiin Patologian keskuslaboratoriossa. Näytemateriaalina oli 50 tuoretta kudospalaa, joista 14 oli tuumorikudosta. Jokaisesta näytteestä leikkasimme kolme palaa. Pala A fiksoitiin J.F.C:llä, palat B ja C formaliinilla. Palojen A ja B fiksointi ja kudosprosessointi tehtiin mikroaaltouunissa ja pala C fiksoitiin huoneenlämmössä ja prosessoitiin yön yli -menetelmällä.</p> <p>HE-värjäyksen perusteella J.F.C ei sovi fiksaatioaineeksi. Mutta mikroaaltouunin käyttö formaliinifiksaatiossa ja kudosprosessoinnissa osoittautui lähes yhtä hyväksi kuin perinteinen menetelmä. Leikkautuvuuteen ja immunohistokemiallisiin värjäyksiin ei näytteen käsittelytavalla näyttäisi olevan vaikutusta.</p>		
Avainsanat		
mikroaaltouuni, fiksaatio, kudosprosessointi, immunohistokemia		

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services
Author/Authors		
Jenni Pitkähälmä, Leni Sappinen ja Anne Savelius-Lipponen		
Title		
Suitability of a Microwave Oven for both Fixation and Tissue Processing and the Usability of a J.F.C-Reagent as a Fixative in the Microwave Method.		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Spring 2007	32 + 5 appendices
<p>ABSTRACT</p> <p>It can take even weeks to get results from a pathology laboratory so it is necessary to develop the treatment process of histological tissue samples to be faster. Working in a pathology laboratory is getting more automate constantly and device manufacturers have commercial reagents that can possibly be also used as fixatives.</p> <p>In this study we were researching if it was possible to perform both fixation and tissue processing in a microwave oven to speed up the treatment process considerably. We also tried the functionality of a commercial J.F.C reagent as a fixative. The objects of this study were to see if the morphology could be preserved on the basis of evaluating hematoxylin and eosin stain, and the functionality of immunocytochemical staining. We also evaluated if a different treatment process influenced the dissection of the tissue sample with a microtome.</p> <p>The research was conducted in the Central Pathology Laboratory. As our sample material we had 50 fresh tissue samples of which 14 were tumor samples. We cut three pieces of each sample. Sample A was fixated on J.F.C and samples B and C with formalin. The fixation and tissue processing of samples A and B were in a microwave oven and sample C was fixated in room temperature and processed with the over night -method.</p> <p>Based on the results of the HE staining the J.F.C was not suitable as a fixative. But the use of a microwave oven in the formalin fixation and tissue processing turned out to be almost as good as the traditional method. To the dissectability and immunocytochemical staining the method of treatment did not seem to have an effect.</p>		
Keywords		
microwave oven, fixation, tissue processing, immunocytochemistry		

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
2 HISTOLOGISEN PREPARAATIN VALMISTUS	6
2.1 Fiksaatio	6
2.1.1 Kiinnitykseen vaikuttavat tekijät	6
2.1.2 Kiinnitteet	7
2.2 Kudosprosessointi	9
2.3 Mikroaaltojen vaikutus fiksaatioon ja kudosprosessointiin	11
2.3.1 Fiksaatio mikroaaltouunissa	12
2.3.2 Kudosprosessointi mikroaaltouunissa	13
2.4 Valu parafiiniin ja mikrotomia	14
2.5 Histokemialliset värjäykset	15
2.6 Immunohistokemialliset värjäykset	16
2.6.1 Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät	17
2.6.2 Immunohistokemiassa käytettyjä vasta-aineita	20
3 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	21
4 TUTKIMUSONGELMA	22
5 TUTKIMUKSEN SUORITUS	23
5.1 Näyttemateriaali	23
5.2 Näytteiden fiksaatio ja kudosprosessointi	24
5.3 Näytteiden leikkaaminen mikrotomilla ja HE-värjäys	24
5.4 Näytteiden immunohistokemialliset värjäykset	25
5.5 Näytteiden arviointi	26
6 TUTKIMUSTULOKSET	23
7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	32
LÄHTEET	34
LIITTEET 1-5	

1 JOHDANTO

Vastauksen saapuminen klinikolle patologian laboratoriosta kestää perinteisillä menetelmillä yleensä useita päiviä, jopa viikkoja. Perinteisessä menetelmässä kudoksia fiksoidaan huoneenlämmössä 12-18 tuntia ja kudosprosessointi kestää yli yön. Tämän takia on yritetty kehittää nopeampia menetelmiä preparaatin valmistamiseksi. Ihmisten sairaalassaoloajat ovat lyhentyneet, joten vastaukset näytteistä olisi saatava nopeammin. Mikroaaltouuni voisi olla hyvä menetelmä nopeuttaa kaikkien näytteiden käsittelyä, jos se olisi rutiinikäytössä. Tulevaisuuden näkymiin kuuluukin täysin automatisoitu mikroaaltouuni. Tällaista menetelmää Morales, Nassiri, Kanhoush, Vincek ja Nadji ("Validation of histologic quality and impact on the timeliness of diagnostic surgical pathology") ovat tutkineet jo useiden vuosien ajan. Tulokset ovat olleet verrattavissa perinteiseen menetelmään. (Morales - Nassiri - Kanhoush - Vincek - Nadji 2004: 528.) Koska mikroaaltouuniprosessoinnissa ei tarvita ksyleeniä, olisi ihanteellista löytää myös fiksointiin joku muu aine kuin formaliini. Näin voitaisiin välttyä näiden aineiden haitallisilta vaikutuksilta.

Työn tarkoitus on selvittää, onko formaliinilla mikroaaltouunissa fiksoiduissa ja käsitellyissä näytteissä eroa perinteisesti huoneenlämmössä fiksoituihin ja yön yli - prosessoituihin näytteisiin verrattuna. Halusimme myös selvittää voisiko kaupallista J.F.C-reagenssia käyttää kudoksen fiksoimiseen mikroaaltouunissa. J.F.C:tä käytetään mikroaaltouuniteknikassa dehydraatoliuoksena ja työskentelyä helpottaisi, jos samaa liuosta voisi käyttää myös fiksaatiossa. Se vähentäisi työvaiheita ja erilaisten haitallisten liuosten käsittelyä laboratoriossa.

Tarkastelun kohteena työssämme ovat leikattavuus mikrotomilla, koska erilaiset käsittelytavat saattavat vaikuttaa kudoksen kovuuteen sekä fiksaation ja kudosprosessoinnin onnistuminen HE-värjäyksen perusteella arvioituna. Tuumorinäytteistä teemme myös immunohistokemiallisia värjäyksiä, joiden perusteella arvioimme, toimivatko vasta-ainevärjäykset samoin eri tavoilla käsitellyissä näytteissä.

Saimme aiheen HUSLABsta Patologian keskuslaboratoriosta. Aihetta tarjottiin meille, koska mikroaaltouunin käyttö on lisääntynyt ja laitevalmistajilla on omia reagenssejä, joita mahdollisesti voisi käyttää myös fiksaatioaineina.

2 HISTOLOGISEN PREPARAATIN VALMISTUS

2.1 Fiksaatio

Näytteen kiinnittämisen eli fiksaation tehtävänä on estää kudoksen hajoaminen solun omien entsyymien (autolyysi) ja bakteerien vaikutuksesta (Srinivasan - Sedmak - Jewell 2002: 1964). Kudoksesta tulee näin kiinteämpi ja sen jatkokäsittely helpottuu (Aho 1989: 6). Näyte fiksoidaan välittömästi elimistöstä irrottamisen jälkeen, näin kudoksen rakenne säilyy mahdollisimman samankaltaisena kuin se on elimistössä ollut (Huhtakallio 1995: 14). Käytetyin fiksaatioaine on formaliiniliuos, jossa näytepala voi säilyä vuosia menettämättä olennaista rakennettaan (Myhre 1993: 200).

Laadukkaan näytteen valmistamiseksi proteiinien säilyminen fiksaatiossa on keskeistä. (Rantala - Naukkarinen - Helin 1998: 65). Kiinnittämisen aikana tapahtuvat tärkeimmät reaktiot liittyvät valkuaisaineisiin. Proteiinien välille muodostuu poikkisidoksista verkko, jolloin kudosten eri osien sijainti toisiinsa nähden pysyy muuttumattomana. (Hopwood 2002: 64.) Liukoisessa muodossa olevat valkuaisaineet kiinnittyvät rakenneproteiineihin. Kudoksesta fiksoidaan yleensä upottamalla se fiksaatioaineeseen eli se immersiofiksoidaan. (Aho 1989: 6.) Kokonaiset elimet voidaan esifiksoida perfusoiden, joka tarkoittaa verisuoniston huuhtelemista verettömäksi fysiologisella suolaliuksella. Tämän jälkeen suolaliuos korvataan fiksaatioaineella, ja näin fiksaatio pääsee tunkeutumaan kudokseen verisuoniston kautta. (Rantala ym. 1998: 67).

2.1.1 Kiinnitykseen vaikuttavat tekijät

Fiksaatioliuoksissa vetyionikonsentraatio säädetään yleensä lähelle fysiologista tasoa, eli pH 6-8 (Hopwood 2002: 69). pH:n noustessa reaktionopeus kasvaa (Hopwood 2002: 24). Liuoksen pH säädetään puskurin avulla, joka ei saa reagoida fiksaatiivin kanssa (Rantala ym. 1998: 67).

Fiksatiivin osmolalisuus vaikuttaa solujen muotoon (Aho 1989: 7). Osmolalisuudella kuvataan liuenneiden molekyylien tai ionien kokonaismäärää mooleina yhdessä kilossa liuosta (Bjälle – Haug - Sand - Sjaastad - Toverud 2002: 446). Hypertoninen liuos kutistaa soluja ja hypotoninen liuos turvottaa soluja ja johtaa puutteelliseen

kiinnitykseen. Lievästi hypertoninen (400-450 mOsm) fiksaatioaine antaa parhaimman kiinnitystuloksen. (Aho 1989: 7.)

Kiinnittämiseen käytettävä aika riippuu näytteen koosta, mutta yleensä vuorokauden fiksaatioaika on riittävä (Aho 1989: 7). Jos kiinnitysaika formaliinilla on liian pitkä, solu kovettuu liaksi ja kutistuu (Hopwood 2002: 71).

Fiksatiivin määrällä on vaikutusta näytteiden kiinnitykseen, ja yleensä fiksaatioainetta tulisi olla kymmenkertainen määrä näytteen tilavuuteen verrattuna. Erittäin suurilla näytteillä sen on oltava vähintään sama kuin näytteen tilavuus. (Rantala ym. 1998: 67.)

Näytteiden kiinnitys tapahtuu yleensä huoneenlämmössä. Elektronimikroskopia ja entsyymihistokemia edellyttävät yleensä jääkaappilämpötilassa tapahtuvaa fiksaatiota. Alhainen lämpötila hidastaa fiksaationopeutta, mutta samalla hidastuu myös autolyysi. (Aho 1989: 6.) Kiireellisten näytteiden fiksointia varten formaliini voidaan lämmittää 60 – 70 °C:een (Leong 1994: 14).

2.1.2 Kiinnitteet

Fiksoimiseen voidaan käyttää useita erilaisia kiinnitteitä. Eniten käytettyjä ovat aldehydit, joista formaldehydin noin 4-prosenttinen vesiliuos, formaliini, on yleisin. Sitä käytetään puskuroituna, neutraalina formaliinina, koska puskuroimaton, hapan formaldehydi saostaa verkkäisiin kudoksiin epätoivottua formaliinipigmenttiä. (Aho 1989: 7.) Neutraalissa pH:ssa formaldehydi on monohydraattimuodossa metyleeniglykolina ja muodostaa metyleenisidoksia polypeptidiketjujen välille stabiloiden näin kudospoteiineja (Rantala ym. 1998: 65). Fiksoidessaan formaliini siis reagoi proteiinien emäksisten lyysiintähteiden kanssa muodostaen niiden välille poikkisidoksia. Uloimpana proteiinimolekyyliin sijaitsevat tähteet muodostavat verkon, eli n. 40-60 % kokonaismäärästä. (Hopwood 1996: 24.) Huoneenlämmössä formaliini ei ole kovin hyvä nukleinihappofiksatiivi, mutta proteiinimatriksin fiksoituminen pystyy säilyttämään myös nukleinihappoja riittävästi. Nukleinihappojen fiksoituminen on tehokasta vasta 45-65°C:ssa. Formaliini on hyvä fiksaatioaine myös rasvoille, tosin kudosprosessoinnissa käytettävät liuottimet poistavatkin ne lähes kokonaan. (Rantala ym. 1998: 66.) Formaliinin aiheuttama reaktio on osin palautuva, purkaminen vesihuuhtelulla on mahdollinen 24 tunnin kuluessa (Hopwood 2002: 64).

Formaliinin etuja ovat hyvät fiksaatio- ominaisuudet. Se aiheuttaa vain pieniä solumuutoksia. Huonoina puolina voi mainita sen aiheuttavan monenlaisia ärsytysoireita. Formaliini hapettuu myös helposti muurahaishapoksi valon ja ilman vaikutuksesta. (Leong 1994: 3.)

Paraformaldehydiä voidaan käyttää fiksointiin sekä höyrynä että vesiliuoksena. Se on kiinteä suurimolekyylinen polymeeri, joka veteen liuotettuna esiintyy monomeerina. Puhdas paraformaldehydi fiksoi hellävaraisemmin kuin formaliini ja siitä puuttuvat formaliinin epäpuhtaudet. Se onkin suosittu fiksaatioaine erikoistekniikoissa, esimerkiksi immunohistokemiassa. (Rantala ym. 1998: 66.)

Proteiineja denaturoivia aineita mm. etanolia ja etikkahappoa käytetään myös fiksointiin. Etanolin 50-prosenttista liuosta voidaan käyttää sytologisten näytteiden fiksaatioon, kuten yskös- ja virtsanäytteisiin. Gynekologinen sivelynäytelasi voidaan kiinnittää 95-prosenttisessä etanolissa. (Aho 1989: 8.)

Pikriinihappo fiksoi hyvin emäksisiä proteiineja muodostaen aminohappojen kanssa pikraatteja. Sitä käytetään mm. Bouinin liuoksessa, joka sisältää formaliniä, etikkahappoa ja pikriinihappoa. Laajentavana aineena etikkahappo kumoaa formaliinin kutistavaa vaikutusta. (Rantala ym. 1998: 66.) Se ei yksinään pysty kuitenkaan kiinnittämään rasvoja ja hiilihydraatteja (Aho 1989: 8). Bouinin liuos on yleisfiksatiivina käyttökelpoinen eikä koveta kudosta yhtä paljon kuin formaliini (Rantala ym. 1998: 66).

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä voidaan fiksatiivinä käyttää mm. elohopeakloridia. Se auttaa monia valkuaisaineita säilyttämään antigeenisuutensa. (Aho 1989: 9.) Elektronimikroskopiassa eniten käytetty fiksatiivi on glutaraldehydi (Rantala ym. 1998: 66). Se muodostaa formaliinin tapaan ristsidoksia kudokseen (Srinivasan ym. 2002: 1966). Sen tunkeutuminen kudoksiin on hidasta, mutta se reagoi proteiinien kanssa nopesti ja palautumattomasti. (Rantala ym. 1998: 66.) Glutaraldehydi antaa morfologiasta paremman kuvan kuin formaldehydi (Hopwood 2002: 64). Jääleikkeissä yleisimmin käytetty fiksatiivi on asetoni (Rantala ym. 1998: 66). Nykyään saatavana on myös kaupallisia liuoksia, jotka sisältävät elohopeaa ja aldehydejä vaarattomampia aineita (Aho 1989: 9).

2.2 Kudosprosessointi

Näytteenä olevasta kudoksesta leikataan pieniä paloja kudoskasetteihin ja ne laitetaan sen jälkeen kudosprossoriin. Ennen kuin kudosta voidaan jatkokäsitellä, on varmistuttava siitä, että se on kokonaan fiksoitunut. Tästä syystä usein kudosprosessoinnin ensimmäinen liuos on formaliini ennen varsinaisia liuottimia. (Anderson - Bancroft 2002:85.) Kudosprosessoinnin tarkoitus on korvata kudoksen sisältämä vesi tukiaineella. Se kovettaa kudoksen, jolloin siitä on mahdollisuus leikata ohuita leikkeitä mikroskooppista tarkastelua varten. Kudosprosessointi käsittää yleensä kaksi vaihetta: dehydraation ja kirkastuksen. (Aho 1989:11; Huhtakallio 1995:15; Internet Pathology Laboratory for Medical Education 1994-2006.)

Dehydraatio suoritetaan nousevassa alkoholisarjassa. Joka alkaa yleensä 50% alkoholista ja nousee viidestä kymmeneen prosenttiyksikköä kerrallaan, kunnes päästään absoluuttiseen alkoholiin. (Aho 1989:11.) Vesi on poistettava kudoksesta, koska yleisimmin tukiaineena käytettävä parafiini ei sekoitu veden kanssa, ja näin ollen ei imeydy kudoksiin, joissa on vettä (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education 1994-2006). Dehydraatio poistaa myös fiksaatioaineen (Aho 1989:11).

Seuraavassa vaiheessa kudokseen imeytetään tukiaineen liuotin. Parafiini ei sekoitu myöskään alkoholin kanssa, joten tarvitaan siirtymäliuotin, joka sekoittuu sekä alkoholin että parafiinin kanssa. Yleisimmin siirtymäliuottimena käytetään ksyleeniä. Ksyleenikäsitelyn on oltava nopea, koska liian pitkä seisotus kutistaa kudosta ja muuttaa sen morfologiaa. Kun alkoholi on saatu poistettua kudoksesta, voidaan tukiaine imeyttää siihen. (Huhtakallio 1995: 15.) Ksyleenikäsitelyn aikana kudos muuttuu läpinäkyväksi, josta tulee termi kirkastus (Anderson - Bancroft 2002: 87).

Tukiaineena käytetään yleisimmin parafiinia. Se on vahamainen mineraaliöljypohjainen hiilivetyseos, jonka sulamispiste vaihtelee 40 – 70 °C:n välillä. Histologiassa parafiiniin lisätään erilaisia aineita, jotta sen kovuus lisääntyisi ja saataisiin ohuempia leikkeitä. (Aho 1989:12.) Prosessoinnin viimeisessä vaiheessa sula parafiini imeytetään kudokseen.

Kudosprosessointi voidaan suorittaa manuaalisesti, mutta yleensä ja varsinkin kun kyseessä on suuret näytemäärät, se tehdään automaattilla. Automaatti siirtää kudoskasetit

liuksesta toiseen siihen asetetun ohjelman mukaan. (Taulukko 1.) (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education 1994-2006.)

TAULUKKO 1. Yön yli kudosprosessointiohjelma pienille näytteille Patologian keskuslaboratoriossa.

REAGENSSI	TARKOITUS	LÄMPÖTILA	AIKA
Formaliini	Kudoksen kiinnitys	Huoneenlämpö	1 h
Formaliini	Kudoksen kiinnitys	Huoneenlämpö	1 h
Alkoholi 50%	Dehydraatio, formaliinin poisto	Huoneenlämpö	1 h
Alkoholi 96%	Dehydraatio, formaliinin poisto	Huoneenlämpö	30 min
Alkoholi 96%	Dehydraatio, formaliinin poisto	Huoneenlämpö	1 h
Abs. alkoholi	Dehydraatio, formaliinin poisto	Huoneenlämpö	30 min
Abs. alkoholi	Dehydraatio, formaliinin poisto	Huoneenlämpö	1 h
Abs. alkoholi	Dehydraatio, formaliinin poisto	Huoneenlämpö	2 h
Xyleeni	Siirtymäliuotin, kudoksen kirkastus	Huoneenlämpö	1 h
Xyleeni	Siirtymäliuotin, kudoksen kirkastus	Huoneenlämpö	1 h 30 min
Parafiini	Vahan imeyttäminen	60 °C	30 min
Parafiini	Vahan imeyttäminen	60 °C	30 min
Parafiini	Vahan imeyttäminen	60 °C	1 h
Parafiini	Vahan imeyttäminen	60 °C	1 h

Automatisoidussa kudosprosessoinnissa on mahdollista käyttää erilaisia toimintoja kuten vakuumia tehostamaan aineiden imeytymistä. Kudoskasettien liikuttelu eli agitaatio vaikuttaa siihen, että aineet pääsevät imeytymään kudokseen tasaisesti joka puolelta. On todettu, että agitaatio vähentää prosessointiaikaa noin 30%. Lämpö tehostaa myös aineiden imeytymistä. 45 asteen lämpötilan on katsottu olevan sellainen, ettei kudoksen rakenne muutu. Tavallisessa kudosprosessoinnissa lämpöä käytetään kuitenkin harvoin. (Anderson - Bancroft 2002: 86.) Tavallisimmin automaatilla tehty kudokäsittely kestää yön yli, eli automaatti käynnistetään työpäivän lopussa ja näytteet ovat seuraavana aamuna valmiita jatkokäsittelyyn. Pitkä prosessointiaika takaa sen, että vesi on varmasti poistunut isommistakin näytteistä ja tukiaine imeytynyt kunnolla. (Milestone Microwave Laboratory Systems 2005.)

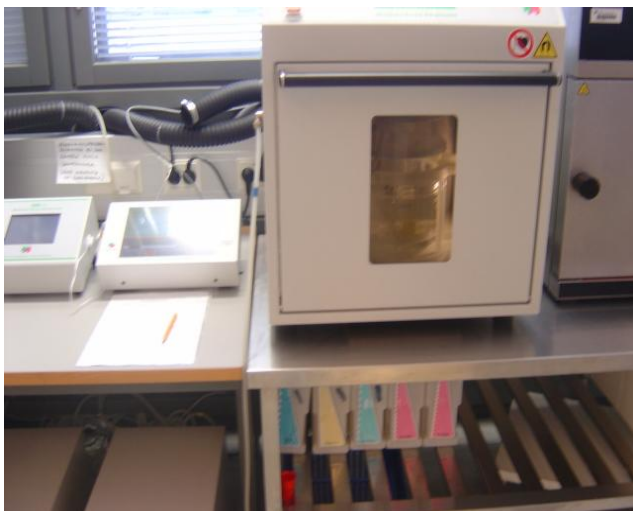
2.3 Mikroaaltojen vaikutus fiksaatioon ja kudosprosessointiin

Mikroaallot ovat elektromagneettisia aaltoja, joiden aallonpituus 2,5 GHz:n taajuudella on 12,2 cm. Mikroaaltoja säätelee sähköinen ja magneettinen kenttä. (Boon – Kok 1987: 11, 14.)

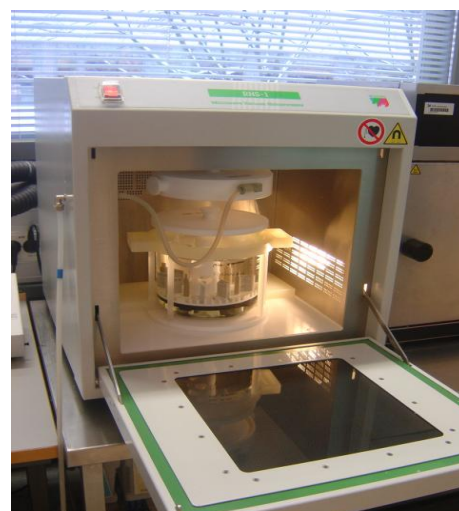
Sähkömagneettisen kentän äärimmäisen nopeat muutokset saavat aikaan dipolaaristen molekyylien, kuten veden ja proteiinien värähtelyä akseliensa ympäri. Tämä värähtely johtaa lämmön syntymiseen, kun molekyylit alkavat törmäillä toisiinsa. Muovi ja lasi ovat sellaisia materiaaleja, joihin mikroaallot eivät vaikuta. Metallit taas sen sijaan heijastaa siihen kohdistuneet mikroaallot takaisin. Kun aine on sellainen että se absorpoo mikroaallot, se jännittyy ja tuottaa lämpöä. (Willis – Minshew 2002: 2.)

Magnetroni on mikroaaltouunin sisällä oleva elektroninen putki, joka muuttaa sähköenergian mikroaalloiksi. Ne ohjataan aallonohjaimen avulla kammioon. Aallot jakaantuvat kuitenkin epätasaisesti, tehden kammioon kylmempiä ja kuumempia kohtia. Lämpö saadaan jakaantumaan tasaisesti, joko liikuttamalla näytettä tai käyttämällä aallonsekoittajaa. Laboratoriokäytössä aallonsekoittaja on tavallisempi. (Slap 2002: 415.)

Tavallista talousmikroaaltouunia voidaan käyttää myös laboratorio-olosuhteissa, mutta markkinoilla on useita laboratoriokäyttöön tarkoitettuja mikroaaltouuneja esimerkiksi Milestonen Rapid Histoprocessing-1 -laite (RHS-1). Siihen kuuluu myös kosketusnäyttö sekä vakuumiyksikkö (kuviot 1, 2). Laitteessa on tietokone, jossa on Windows CE – käyttöjärjestelmä. Mikroaaltouunin maksimiteho on 800 wattia ja tehoa voidaan säätää 10 watin välein. Laitteen takaseinässä on infrapunasensori lämpötilan mittaamista



KUVIO 1. RHS-1 –laite ja kosketusnäyttö.



KUVIO 2. RHS-1 –laite ja näyteastia.

varten ja laitteen pohjassa on aallonsekoittaja. Laitteessa on myös vakuumikansi, joka asetetaan astian päälle niissä vaiheissa, joissa vakuumia tarvitaan. Vakuumiyksikköön kuuluva kondensori sijaitsee itse laitteen ulkopuolella. Valmistaja on tallentanut laitteeseen valmiiksi 71 ohjelmaa, ja uusille ohjelmille on varattu yli 100 paikkaa. Lämpötilan, tehon, ajan ja vakuumin ohjaus toimii tietokoneen avulla. Laitteeseen mahtuu kerrallaan 110 kuduskasettia. Laitetta käytetään manuaalisesti eli jokaisen vaiheen jälkeen vaihdetaan liuos ja laitetaan astia takaisin mikroaaltouuniin (Milestone Microwave Laboratory Systems 2005.)

2.3.1 Fiksaatio mikroaaltouunissa

Fiksaatiossa mikroaaltoja voidaan käyttää nopeuttamaan sekä kemiallisia reaktioita että fiksatiivin diffuusiota kudokseen (Boon - Kok 1987: 78). Huoneenlämmössä tapahtuva fiksaatio perustuu aineen hitaaseen imeytymiseen kudoksen ulkopinnalta. Mikroaaltojen käyttö fiksaation nopeuttamisessa perustuu sisältä ulospäin tapahtuvaan lämpenemiseen. (Willis - Minshew 2002: 2.) Lämpenemisen lisäksi molekyylien liikettä on pidetty

tärkeänä vaikuttajana kudoksen nopeaan fiksoitumiseen mikroaaltouunissa. Molekyylien törmätessä toisiinsa kemialliset reaktiot nopeatuvat. (Leong 1994: 8.)

Formaliinifiksaatiossa on kolme kohtaa, joihin mikroaalloilla voidaan vaikuttaa: metyleeniglykolin imeytyminen kudokseen, formaldehydin muodostuminen kudoksessa metyleeniglykolin dehydraation seurauksena sekä ristsidosten muodostuminen proteiiniketjujen välille. Huoneenlämmössä nämä kolme vaihetta tapahtuvat hitaasti, ja kestää kudoksen koosta riippuen reilun vuorokauden ennen kuin kudos on fiksoitunut. (Boon - Kok 1987: 79.) Formaliinifiksaatio RHS-1 -laitteella kestää 3x5x10mm kokoiselle näytepalalle vain 25 minuuttia.

RHS-1 -laitteen valmistajalla on kaupallinen J.F.C-reagenssi, jota mahdollisesti voisi käyttää fiksaatioaineena mikroaaltouunimenetelmässä. Sen tarkkaa reseptiä ei tunneta, mutta todennäköisesti se sisältää etanolia, isopropanolia ja pitkäketjuisia hiilivetyjä. Se on kirkas, väritön ja pistävänhajuinen neste. (Milestone Microwave Laboratory Systems 2005.)

2.3.2 Kudosprosessointi mikroaaltouunissa

Mikroaaltojen käyttö kudosprosessoinnissa, samoin kuin fiksaatossa, perustuu aineiden imeytymisen nopeuttamiseen (Milestone Microwave Laboratory Systems 2005). Perinteinen kudosprosessointi kestää yli yön ja käsittää yleensä 12 vaihetta. Mikroaaltouunilla prosessointi pystytään suorittamaan muutamassa tunnissa ja siihen riittää vain kolme vaihetta. (Boon ym. 1987: 85.) RHS-1 -laitteella tehdyssä prosessoinnissa ensimmäisessä vaiheessa tapahtuu näytteiden samanaikainen dehydraatio ja kirkastus J.F.C-reagenssilla. Toisessa vaiheessa mikroaallot kuivattavat näytteet vakuumitilassa ja poistavat ensimmäisessä vaiheessa käytetyn liuoksen. Kolmannessa vaiheessa imeytetään parafiini vakuumitilassa näytteisiin. (Taulukko 2.) (Milestone Microwave Laboratory Systems 2005.) Huomattavaa on, että mikroaaltoprosessoinnissa ei tarvita nousevaa alkoholisarjaa, koska mikroaallot tehostavat dehydraatiota niin, että veden poistumiseen kudoksesta riittää vain yksi vaihe. (Willis ym. 2002: 2).

TAULUKKO 2. Kudosprosessointiohjelma mikroaaltouunilla 3x5x10mm kokoisille kudospaloille Patologian keskuslaboratoriossa.

REAGENSSI	TARKOITUS	AIKA	VAKUUMI
J.F.C	Dehydraatio, kudoksen kirkastus	35 min	Ei
Ei reagenssia	Kuivaus	1 min 30 sek	Kyllä
Parafiini	Vahan imeyttäminen	42 min	Kyllä

2.4 Valu parafiiniin ja mikrotomia

Kun näyte on läpikäynyt kudosprosessoinnin, se valetaan parafiiniin metallisen muotin avulla. Näin saadaan aikaiseksi näyteblokki, josta voidaan leikata mikrotomilla ohuita leikkeitä mikroskooppista tarkastelua varten. (Anderson ym. 1996: 52; Naukkarinen 2000: 53.) Metalliseen muottiin valutetaan sulaa parafiinia ja kudospala asetetaan siihen suurin pinta alaspäin. Näin varmistutaan siitä, että näytteestä saadaan mikrotomilla edustavia leikkeitä objektilasille. Muotin päälle lisätään vielä kudosprosessoinnissa käytetty kudokasetti ja parafiinin annetaan jähmettyä. Kun metallinen muotti irtaana, on näyteblokki valmis. (Rantala ym. 1998: 68.)

Terävällä veitsellä, joka on kiinni mikrotomissa, pystytään näyteblokista leikkaamaan ohuita, yleensä 3-5 μ m:n paksuisia leikkeitä objektilasille. Kun leikkeet värjätään, saadaan mikroskoopilla näytteiden yksityiskohdat esille. (Naukkarinen 2000: 53.) Mikrotomeja on saatavilla eri mallisia, mutta yleisimmin käytetään rotaatio- ja liukumikrotomeja. Rotaatiomallissa adapterissa kiinni oleva näyteblokki liikkuu ja veitsi on paikallaan kun taas liukumikrotomissa liikutetaan veistä ja näyteblokki on paikallaan. Veitsen teräkulma on yleisimmin 17-23° ja leikattaessa veitsen ja blokin väliin jää 2-3° vapaakulma. (Anderson ym. 1996: 58,63; Rantala ym.1998: 70.)

Ennen kuin näyteblokista voidaan leikata ohuita leikkeitä, on blokki trimmattava. Näin saadaan ylimääräinen parafiini pois kudospalan edestä ja koko kudoksesta tulee näkyviin, jolloin siitä saadaan laadukkaita leikkeitä objektilasille. Trimmauksen jälkeen blokki laitetaan kylmälevylle. Kun itse kudoksesta ja sitä ympäröivä parafiini viilenevät, on mikrotomilla leikkaaminen helpompaa. Ohuet leikkeet saadaan objektilasille käyttämällä apuna siveltimiä ja vesihaudetta. Siveltimellä leike saadaan varovasti

siirrettyä lämpimään vesihauteeseen. Vesihauteen lämpötilan on oltava noin kymmenen astetta alle parafiinin sulamislämpötilan. Vesihauteesta leike ohjataan objektilasille ja laitetaan kuivumaan lämpölevylle, jonka lämpötila on sama kuin parafiinin sulamispiste. Normaalisti käytetään objektilaseja, joiden koko on 76x25 mm ja paksuus 1,0-1,2 mm. (Anderson ym. 1996: 62-64.)

Laadukkaiden leikkeiden leikkaaminen on vaikeaa ja kudoksen kovuus vaikuttaa leikkeiden onnistumiseen. Terävä veitsi, onnistunut kudospalan fiksointi ja kudosprosessointi takaavat, että mikrotomilla leikkaaminen onnistuu. (Anderson ym. 1996: 63.)

2.5 Histokemialliset värjäykset

Mikroskooppiseen tarkasteluun saapuvat kudospätkät ovat läpikäyneet prosessin, jossa niiden koostumus on säilynyt lähes alkuperäisen kaltaisena. Parafiini on saatava pois ennen värjäystä ja leikkeisiin on palautettava prosessoinnissa poistettu vesi, koska useimmat histologiset värit ovat vesiliukoisia. (Naukkarinen 2000: 153.)

Kudosten rakenteita paikallistetaan histokemiallisten värjäysmenetelmien avulla ja ne tehdään mikroskoopilla havaittaviksi. (Myhre 1993: 200). Näytteet värjätään tekniikoilla, jotka perustuvat tunnettuihin kemiallisiin reaktioihin. Värjäystekniikoiden avulla voidaan osoittaa kudoksen tai solun osia tai solun tuottamia aineita. Tällaisia aineita ovat entsyymit, kollageenit, pigmentit ja hiilihydraatit. (Huhta-Kallio 1995: 24.) Parafiinileikkeiden värjäämiseen käytettäviä väriaineita tiedetään satoja. Useimmat väriaineet valmistetaan nykyisin synteettisesti. Histologisiin värjäyksiin käytettyjen värien täytyy absorboida valoa ja sitoutua värjättävään kudokseen. Monet histologiset värjäysmenetelmät on kehitetty jo 1800-luvulla tai 1900-luvun alussa. Näitä värjäysmenetelmiä on sellaisenaan tai toisenlaisina modifikaatioina käytössä vielä 2000-luvullakin. (Naukkarinen 2000: 153.) Kudospätkät värjätään tavallisesti ainakin kahdella eri värillä, näistä toinen on hapan ja toinen emäksinen. Yleisimmin käytössä on hematoksyliini-eosiini- eli HE-värjäys. (Myhre 1993: 200.)

Hematoxylin campechianum –puun ytimeä saadaan uuttamalla luonnon omaa väriainetta hematoksyliinia. Hematoksyliini ei värjää kudospätkiä, vaan sen hapettunut muoto hemateiini. Hemateiinilla on huono sitoutumiskyky kudokseen, joten

sitovana aineena eli mordanttina käytetään alumiinin, raudan tai wolframin suoloja. Mordantin lisäyksen jälkeen hemateiini toimii emäksenä. Mordantin puuttuessa hematoksyliini värjää erilaisia mineraaleja, kuten kalsiumia, rautaa, lyijyä ja kuparia. (Naukkarinen 2000: 153.) Koska hapettuminen on jatkuvaa ja hemateiini sakkautuvaa, on kemiallisesti hapetetun hematoksyliinin käyttöikä rajallinen. (Helin - Naukkarinen - Rantala 1998: 75)

Kudosnäytteen mikroskooppisessa tutkimuksessa on tarkoitus saada käsitys näytteen yleisrakenteesta eli morfologiasta. Kudoskomponentit värjäytyvät HE-värjäyksessä niiden happamuuteen/emäksisyyteen perustuen. Hematoksyliini värjää happamia kudossia siniseksi, kuten nukleiinihappoja, siksi se on hyvä tumaväri. (Naukkarinen 2000: 153-154.)

Emäksisiin ryhmiin (esimerkiksi proteiinien histidiini, lyysiini ja arginiini) sitoutunut eosiini on hapan ksantiiniväri, joka tunkeutuu hyvin tiheisiin (esimerkiksi punasolut) ja löyhiin (esimerkiksi kollageeni) kudusrakenteisiin värjäten nämä punaisen eri sävyillä. Eosiinia on saatavilla sekä vesiliukoisena (Eosin Y) että alkoholiliukoisena (Eosin S), josta ensin mainittu on tavallisin hematoksyliinin vastaväri. Vedellä tai miedolla emäksellä tehty differentointi määrää värille lopullisen sävyn. Väri haihtuu hitaasti tiheistä rakenteista, ja tätä käytetään hyväksi mm. eosinofiilien identifiointiin. Värjäyksen jälkeen vesi poistetaan leikkeistä nousevassa alkoholisarjassa, useimmiten etanolilla. Alkoholilla poistetaan ksyleenillä, jolloin leike kirkastuu valoa hyvin läpäiseväksi. Lopuksi liimataan peitinlasi leikkeen päälle ksyleeniliukoisella peiteaineella. Peiteaineen kovetuttua leike on valmis mikroskopoitavaksi. (Helin - Naukkarinen - Rantala 1998: 76-77.)

2.6 Immunohistokemialliset värjäykset

Immunohistokemialliset värjäykset on luokiteltu erikoistutkimuksiin, joilla on tärkeä asema kliinisessä patologiassa kasvainten luokittelussa ja tunnistamisessa. Värjäyksissä osoitetaan tutkittavassa kudoksessa olevia valkuaisaineita (antigeeni) niitä vastaan tuotetuilla vasta-aineilla (antibody), jotka ovat joko poly- tai monoklonaasia. Käytetyt vasta-aineet ovat yleisesti joko IgG- luokkaa, joskus myös IgM-luokkaa. Polyklonaalissa vasta-aineita voidaan tuottaa ruiskuttamalla puhdasta immunogeenistä antigeeniä koe-eläimeen (esim. kani, vuohi, sika, ja hevonen), jota vastaan eläimessä muodostuu vasta-

ainetta. Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan soluviljelmällä käyttäen hybridomatekniikka, jossa koeläimen (hiiren) plasmasolut ja neoplastiset myeloomasolut yhdistetään (Naukkarinen 2005: 4-5). Tällöin vasta-aine muodostuu vain tiettyä valkuaisaineen osaa eli epitooppia kohtaan. Immunohistokemiassa antigeeni visualisoidaan jonkin merkkiaineen avulla, joka voi värjäystekniikasta riippuen olla mm. fluoresoiva tai kromogeeninen (Huhta-Kallio 1995: 24.)

Diagnostisessa patologiassa käytetään vasta-aineita, joilla paikannetaan eri solutyypeille ominaisia rakenneproteiineja (mm. tukiranka ja pintaproteiinit), eriteproteiineja (mm. hormonit) tai solujen informaation siirtoon käyttämiä proteiineja (mm. reseptorit). (Laasonen - Rantala. 2000: 148.) Tavallisimpia vasta-aineisiin liitettyjä (konjugoituja) molekyyliä ovat erilaiset fluorokromit, entsyymit ja biotiini. Varsinaisia merkkiaineita ovat fluorokromit ja entsyymit. Ligandina voidaan käyttää esim. biotiinia, jonka sitoutumista avidiiniin käytetään hyväksi merkkiaineiden liittämässä vasta-aineantigeenireaktion yhteyteen (Naukkarinen - von Boguslawsky 1998: 135.). Nykyisin suositeltavaa on käyttää polymeeripohjaisia detektiomentelmiä, joissa vasta-aineeseen sitoutuneeseen polymeerirunkoon on konjugoitu entsyymimolekyyliä (Dabbs 2006: 13).

2.6.1 Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät

Formaliinifiksaatiossa muodostuvat ristsidokset peittävät antigeeniepitooppeja alleen. Ennen kuin immunohistokemiallisia värjäyksiä voidaan suorittaa, on antigeenit paljastettava esikäsittelmällä näytteet joko entsyymaattisesti tai korkeaa lämpötilaa hyväksikäyttäen. Entsyymikäsittelyssä ristsidoksia poistetaan erilaisilla proteaaseilla. Korkean lämpötilan menetelmissä esikäsittelyliuos kuumennetaan kiehuvaan. Yleensä kuumennus tehdään mikroaaltouunilla. Esikäsittelyliuoksia on olemassa useita ja niistä suosituimpia ovat sitraattipuskuri (pH 6,0) ja Tris-EDTA (pH 9,0) (Naukkarinen 2005:17). Paljastettavaksi haluttava antigeeni määrää sen, mitä esikäsittelyliuosta käytetään ja minkälaisen pH:n se vaatii. Alkalinen esikäsittelyliuos sopii useimmille epitoopeille. Mikroaaltouunitekniikka perustuu sekä lämmön ja puskurin yhteisvaikutukseen että elektromagneettisten aaltojen aikaan saamaan molekyylien varausten uudelleen jakautumiseen. (Laasonen ym. 2000:151; Miller 2002: 430-431, 439; Naukkarinen ym.1998:151.)

Antigeenien paikannuksessa käytetään pääasiassa 5 erilaista tekniikkaa (Dabbs 2006:8-14). Suorassa menetelmässä merkkiaine on yhdistetty antigeenispesifiseen primaarivasta-aineeseen. Menetelmä on nopea, mutta koska se on varsin epäherkkä, sitä käytetään vain jääleikkeiden immunofluoresenssitutkimuksiin. Konjugoitujen primaarivasta-aineiden laaja käyttö on kallista ja myös epäkäytännöllistä. (Laasonen ym. 2000: 149.)

Epäsuorassa menetelmässä kudosleikettä inkuboidaan ensin leimaamattomassa primaarivasta-aineessa. Merkkiaineella leimattu sekundaarivasta-aine on toisena kerroksena, jonka primaarivasta-aine on spesifi antigeeni. Entsyymi osoitetaan substraatin ja kromogeenin avulla kolmannessa vaiheessa. Koska useita sekundaarivasta-ainemolekyylejä voi yhdistyä primaarivasta-aineen eri epitoppeihin, on epäsuora menetelmä suoraa herkempi. (Laasonen ym. 2000: 149; Naukkarinen ym. 1998: 144.)

Entsyymi-antientsyymimenetelmässä entsyymi (yleensä peroksidaasi tai alkalinen fosfataasi) on liittynyt vasta-aineeseen antigeeni-vasta-ainereaktiolla entsyymi-antientsyymimenetelmässä. Kolmesta peroksidaasientsyymistä ja kahdesta vasta-ainemolekyylisestä muodotuu stabiili peroksidaasi-antiperoksidaasi- eli PAP-kompleksi. Jos puolestaan käytetään alkalinen fosfataasi-antialkalinen fosfataasikompleksia, niin silloin kompleksi muodostuu kahdesta entsyymistä ja yhdestä vasta-ainemolekyylisestä (APAAP-kompleksi). Värjäys on kummassakin tavassa nelivaiheinen. Ensimmäinen inkubointi tapahtuu leimaamattomassa primaarivasta-aineessa ja toinen leimaamattomassa sekundaarivasta-aineessa. Leikettä inkuboidaan entsyymi-antientsyymikompleksissa kolmannessa vaiheessa ja entsyymi osoitetaan substraatti-kromogeenireaktiolla neljännessä vaiheessa. Jotta sekundaarivasta-aine liittyy primaarivasta-aineeseen ja entsyymikompleksi vasta-aineeseen yhteen, on ne oltava samasta eläinlajista. (Naukkarinen ym. 1998: 145.)

Leimattu avidiini-biotiinin menetelmä (LAB) ja avidiini-biotiini-kompleksimenetelmä (ABC) ovat yleisesti käytössä olevat vaihtoehdot avidiini-biotiinin menetelmässä. LAB:ssa merkkiaine on liitetty avidiiniin. ABC:ssa avidiini, merkkiaine ja biotiini muodostavat kompleksin, jossa entsyymi on kiinnittyneenä biotiiniin ja biotiini

avidiniin. Biotiinia sitovia vapaita kohtia, joilla kompleksi kiinnittyy biotinyloituun sekundaarivasta-aineeseen, on avidiinissa. Avidiini sitoutuu biotinyloituun sekundaarivasta-aineeseen molemmissa menetelmissä. (Naukkarinen ym. 1998: 146.) On kuitenkin muistettava, että joissakin kudoksissa on luonnostaan biotiinia, jonka esiintulo lisääntyy esikäsittelyssä ja näkyy mikroskoopissa ikävänä taustana ja vääränä positiivisuutena (Dabbs 2006:32).

Nykyään on käytössä paljon myös paljon erilaisia polymeeridetektimenetelmiä, joissa vasta-aineet ja entsyymit on liitetty polymeerirunkoihin. Polymeerirunkojen pituuden ansiosta niihin voidaan liittää useita vasta-aine- ja entsyymirakenteita, joiden avulla detektimenetelmä saadaan herkäksi. Polymeeritekniikkoja käytettäessä päästään eroon endogeenisen biotiin aiheuttamista ongelmista (Naukkarinen 2005:22, Dabbs 2006:32).

Merkkiaineena käytetyn entsyymin osoitusreaktio tehdään kaikissa immunohistokemiallissa värjäysmenetelmissä viimeisenä vaiheena. Kudoserakenteiden tarkastelua helpottaa, kun näytteet lopuksi vastavärjätään tumavärillä (yleensä hematoksyliini). Sopivilla suodattimilla saadaan näkymään fluorokromit fluoresenssimikroskoopissa. Jos tumaväriä käytetään fluoresenssimikroskopoitaessa, on se fluoresoitava samalla heräteaaltopituudella kuin merkkiaine. (Laasonen ym. 2000: 150.)

Taustavärjäytyminen vaikeuttaa näytteiden tulkintaa ja sen voi aiheuttaa monet eri tekijät. Taustavärjäytymistä aiheuttavat selvien menetelmävirheiden lisäksi kudoksen puristuminen tai kuivuminen ennen värjäystä, autolyysi, nekroottiset alueet leikkeessä sekä epätäydellinen fiksaatio. Vasta-aineet ja epitootit voivat myös ristireagoida. Kudosten oma ns. endogeeninen peroksidaasiaktiivisuus haittaa peroksidaasin käyttöä joissakin kudoksissa, koska se antaa samanlaisen sakan kuin merkkiaineen käytetty entsyymi. Peroksidaasiaktiivisuutta (mm. punasolujen hemoglobiini) on kaikissa hemoproteiineissa. Yleensä peroksidaasiaktiivisuus on vaimennettavissa, mutta ei aina. On vaikea etukäteen varautua proteiinien välisiin reaktioihin, jotka usein johtuvat epäspesifisestä taustavärjäytymisestä. Kudokäsittelyt (fiksointi ja prosessointi) kasvattavat proteiinien välistä ja värjäystä haittaavaa vuorovaikutusta.

Esikäsittelymenetelmät voivat saada aikaan taustan värjäytymistä ja vääriä positiivisia tuloksia. (Laasonen ym. 2000: 151 - 152.)

Joka värjäyserän yhteydessä on pidettävä mukana kontrolleja, joilla varmistetaan immunohistokemillisten värjäysten spesifisyys. Kaksoisvärjäyksissä on oltava kahdet kontrollit. Kaupallisesti saatavilla olevat, värjäyksissä käytettävät ei-immunologiset reagenssit ovat korkealaatuisia. Reagenssiliuoksia tehdessä on syytä kontrolloida laitteet (vaaka, pH-mittari, automaattipipetit) ja liuospitoisuudet. (Naukkarinen ym. 1998: 153.)

2.6.2 Immunohistokemiassa käytettyjä vasta-aineita

CD10 on yksiketjuinen solun pinnalla oleva glykoproteiini, joka painaa n. 100kDa. CD10 kutsutaan myös nimellä CALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen). CD10 antigeenia esiintyy normaaleiden ja neoplastisten solujen pinnalla. CD10 ilmentyy suurimmassa osassa lymfoblastisia leukemioita/lymfoomia, follikulaarisissa lymfoomissa sekä Burkittin lymfoomassa. Muissa kuin veritautineoplasioissa CD10 ilmentyy mm. munuaissolusarkoomissa. (Ellis 2002: 520; Vision Biosystems.)

CD20 antigeeni on solumembraanilla sijaitseva proteiini, joka on hyvin spesifinen B-soluille. Se osallistuu B- soluaktivaatioon ja solujen erilaistumiseen. CD20 ilmeneminen häviää juuri ennen terminaalista B- solujen erilaistumista plasmak soluiksi. CD20 antigeenia esiintyy normaaleissa ja maligneissa B-soluissa. CD20 ilmentyy pääasiallisesti B-soluleukemioissa ja B-solulymfoomissa. (Ellis 2002: 520; Vision Biosystems.)

Ki-67 (MIB-1) on ihmisen tumassa oleva proteiini. Sillä on tärkeä rooli soluproliferaatiossa eli solun jakautumisessa. Ki-67 ilmentyy kaikissa muissa solusyklin vaiheissa (G1, S, G2 ja mitoosi), paitsi solujen lepovaiheessa (G0). Ki-67 esiintyminen pahanlaatuisissa kasvaimissa liittyy taudin aggressiiviseen kulkuun. (Ellis 2002: 522; Vision Biosystems.)

Sykliini-D1 on 36kD painava tumaproteiini, joka kuuluu suureen sykliiniperheeseen. Sykliineillä on keskeinen rooli solusykliinsäätelyssä. Sykliini-D1 -värjäystä käytetään erityisesti manttelisolulymfomien diagnosointiin. (Ellis 2002: 522; Vision Biosystems.)

ER eli estrogeenireseptori kuuluu steroidireseptoriperheeseen. Se ilmentyy solujen tumissa. ER välittää eri kudoksissa esimerkiksi rintarauhasessa sukupuolihormonien säätelytoimintoja kuten solun kasvua ja erilaistumista. ER ilmentyy n.60% rintasyöpätapauksista. (Krenacs - Bagdi - Krenacs 2002: 508; Vision Biosystems.)

p53- geeni on tuumorisupressorigeeni, joka sijaitsee kromosomissa 17. p53 proteiini liittyy vahvasti syöpien syntymiseen. Sitoutumalla DNA:han normaali p53 säätelee solun kasvua ja jakautumista. DNA-vaurion yhteydessä p53 estää solusykliä etenemästä, kunnes vaurio DNA:ssa on saatu korjattua. Niissä tapauksissa, joissa DNA-vaurion korjaaminen ei onnistu, p53 ajaa solun apoptoosiin. (Krenacs ym. 2002: 505; Vision Biosystems.)

C-erbB-2 (HER2) on solukalvolla esiintyvä onkoproteiini, painoltaan 190kD. Kasvutekijäreseptori c-erbB-2 runsasta esiintymistä havaitaan monissa syöpäkasvaimissa solujen pinnalla. C-erbB-2 geenimonistumaa tavataan n.15-20% rintasyövissä. (Krenacs ym. 2002: 504; Vision Biosystems.)

Kromograniini-A on kalsiumia sitova glykoproteiini, jonka paino on 68kD. Sitä esiintyy neurosektorisissa granuloissa kaikissa neuroendokriinisissa soluissa ja neuroneissa. Kromograniini-A:ta löytyy suuresta osasta epiteliaalisista neuroendokriinisista tuumoreista, esimerkiksi paratyroideatuumoreista, haiman saarekesolutuumoreista sekä medullaarisesta kilpirauhaskarsinoomasta. (Krenacs ym. 2002: 502; Vision Biosystems.)

3 AIKAISEMMA TUTKIMUKSET

Mikroaaltouunitekniiikan käyttöä sekä fiksointiin että kudosprosessointiin patologian laboratorioissa on tutkittu paljon ja tulokset ovat olleet hyviä. Willis ja Minshew ("Microwave Technology in the Histologic Laboratory") vertailivat perinteistä kudosprosessointia mikroaaltouuniprosessointiin. Tuloksista ilmeni, että morfologia ja immunohistokemialliset värjäykset olivat samanlaisia molemmilla tekniikoilla. (Willis ym. 2002: 2.) Boon ja Kok ("Formaldehyde fixation and microwave irradiation") tutkivat erilaisia fiksointilämpötiloja. He kokeilivat 50, 55 ja 65 asteen lämpötiloja, ja eivät havainneet niissä valomikroskooppisia eroja. (Boon ym. 1987: 71 - 72.) Leong ja Duncis ("Antigen preservation in microwave-irradiated tissues: a comparison with formaldehyde fixation") tulivat tutkimuksessaan siihen tulokseen että 62 asteen lämpötila säilytti kudasantigeenit parhaimmin, vaikka morfologia säilyikin hiukan paremmin korkeammissa lämpötiloissa (Leong 1994: 8 – 9). Yli 65 asteen lämpötila aiheuttaa muutoksia, jotka vaikeuttavat valomikroskooppista tarkastelua, esimerkiksi vakuolisaatiota, sytoplasman ylivärjäytymistä sekä pyknoottisia tumia (Hopwood 2002: 66).

4 TUTKIMUSONGELMA

Mikroaaltouunin käyttö patologian laboratoriossa lisääntyy koko ajan ja Patologian keskuslaboratorioon ollaan hankkimassa uutta automaattista mikroaaltokudosprosessoria. Uuden laitteen käyttöönoton myötä voisi mahdollisesti ottaa käyttöön laitteelle sopivia uusia kiinnitysaineita ja -tapoja. Formaliinilla on fiksoitu mikroaaltouunissa ja huoneenlämmössä ennenkin, mutta isopropyylialkoholipohjaista fiksaatioainetta (J.F.C) ei ole aikaisemmin kokeiltu. Haluaisimme kokeilla voisiko J.F.C:tä käyttää mikroaaltouunimenetelmässä myös fiksaatioaineena, koska sitä kuitenkin käytetään dehydraatioliuoksena mikroaaltouunikudosprosessoinnissa. Pikamenetelmiä halutaan kehittää myös patologian laboratorioissa, ja jos mikroaaltouunifiksatio ja -kudosprosessointi otettaisiin rutiinikäyttöön, vastauksen saaminen nopeutuisi huomattavasti.

1. Millä tavoin formaliinilla ja J.F.C:llä mikroaaltouunissa fiksoidut kudokset eroavat toisistaan HE-värjäyksen perusteella?

2. Miten ns. pikakäsitelty näyte eroaa perinteisellä tavalla käsitellystä näytteestä leikkautuvuuden ja HE-värjäyksen perusteella arvioituna?

3. Miten pikakäsitelty tuumorinäyte eroaa perinteisellä menetelmällä käsitellystä tuumorinäytteestä kudoksille tyypillisten immunohistokemiallisten värjäysten perusteella arvioituna?

5 TUTKIMUKSEN SUORITUS

Tutkimuksen empiirinen osuus suoritettiin Patologian keskuslaboratoriossa 22.1.2007-27.2.2007 välisenä aikana.

5.1 Näytemateriaali

Keräsimme tuoreinäytteitä tutkimuksen empiirisen osuuden suorittamisen ajan ja saimme kerättyä yhteensä 50 näytettä joista 14 oli tuumorikudosta. (Taulukko 3.) Näytemateriaali koostui Patologian keskuslaboratorion tuorepuolelle tulleista näytteistä, joista ei tarvittu diagnostiseen käyttöön kokonaista kudospalaa. Tutkimuksen materiaali sisälsi useaa eri kudosta, koska tuoreinäytteitä oli vaikea saada. Näin saimme otoskoon niin suureksi kuin mahdollista. Isot kudospalat käytimme kokonaan, jolloin saimme yhdestä palasta monta näytettä.

TAULUKKO 3. Tutkimuksen näytemateriaali.

KUDOS	NÄYTEMÄÄRÄ
Rinta	5
Virtsarakko	1
Perna	4
Peräsuoli	5
Paksusuoli	1
Kitarisa	1
Kilpirauhanen	3
Mahalaukku	1
Keuhko	6

Istukka	9
Rintatuumori	2
Lisämunuaistuumori	4
Imusolmuketuumori	8

5.2 Näytteiden fiksaatio ja kudosprosessointi

Leikasimme näytteistä kolme 3x5x10mm kokoista palaa, jotka jaoin kolmeen eri kasettiin. (Liite 1.) Kasetteihin kirjoitettiin alkuperäinen näytenumero, kudostyyppi sekä A-, B- tai C-tunnus. Tuumorinäytteisiin lisättiin myös T-tunnus merkiksi tuumorikudoksesta. A-tunnuksella merkityt kasetit fiksoitiin J.F.C:llä, B-tunnuksella merkityt fiksoitiin formaliinilla. Nämä molemmat fiksaatiot suoritettiin mikroaaltouunissa ja molemmat näytteet myös prosessoitiin mikroaaltouunissa. Käytimme alkuperäistä näytenumeroa, jotta kudokset voitaisiin tarpeen mukaan jäljittää. C-tunnuksella merkityt kasetit laitettiin heti formaliiniin huoneenlämpöön fiksoitumaan. Ne prosessoitiin vasta seuraavana päivänä perinteisellä yön yli -menetelmällä Leica ASB 300 -kudoskäsittelyautomaatilla.

RHS-1 -laitteella tehtävän mikroaaltouunifiksaation aloitimme J.F.C-liuoksella. A-tunnuksella merkityt kasetit laitettiin J.F.C:hen, ja käynnistettiin 25 minuuttia kestävä fiksaatio-ohjelma. B:llä merkityt kasetit laitettiin valmiiksi formaliiniin odottamaan omaa fiksaatiovuoroaan. Näin saimme vakioitua fiksaatioajat, koska J.F.C:llä fiksoidut näytteet puolestaan odottivat omassa liuoksessaan sen aikaa kun formaliinifiksaatio oli käynnissä. Kun fiksaatiot oli tehty, laitettiin kaikki kasetit J.F.C-liuokseen ja aloitettiin kudosprosessointi RHS-1 -laitteella. Ensimmäinen vaihe kesti 35 minuuttia, jonka aikana tapahtui dehydraatio ja kirkastus J.F.C-reagenssilla. Sen jälkeen kasetit siirrettiin tyhjään astiaan ja käynnistettiin 1 min 30 sek kestävä, vakuumitilassa tapahtuva kuivausohjelma. Kuivauksen jälkeen kasetit siirrettiin sulaan parafiiniin ja käynnistettiin 42 minuuttia kestävä kudosprosessoinnin viimeinen vaihe, jossa parafiini imeytyi näytteisiin vakuumin avulla.

5.3 Näytteiden leikkaaminen mikrotomilla ja HE-värjäys

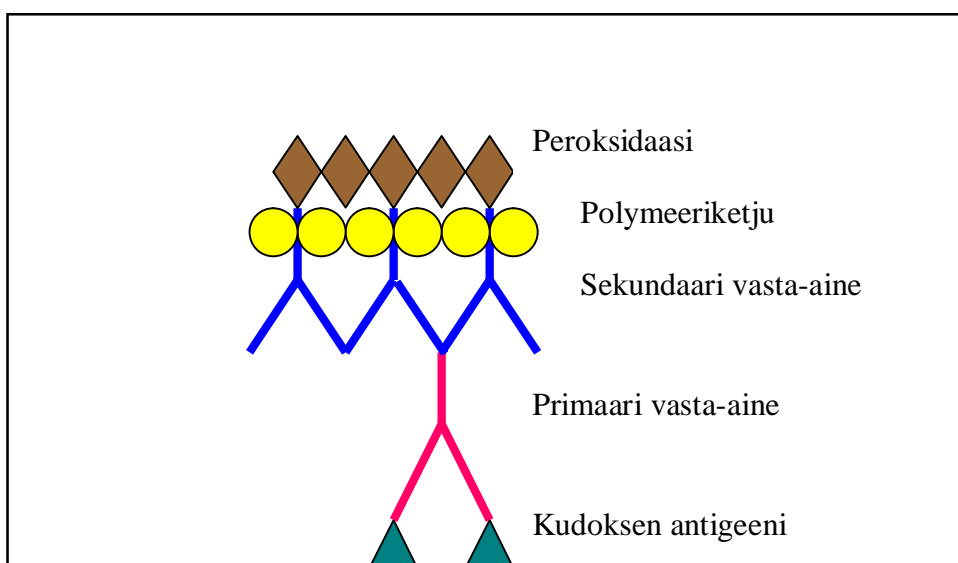
Prosessoinnin loputtua näytteet valettiin parafiiniin. Jokaisesta näyteblokista (yhteensä 150 blokkia) leikattiin mikrotomilla yksi lasi HE-värjäystä varten ja tuumorinäytteistä lisäksi immunohistokemiallisia värjäyksiä varten kaksi lasia. Leikkautuvuuden arviointia varten kokenut laboratoriohoitaja leikkasi mikrotomilla 39 lasia ja itse leikkasimme loput 111 lasia. HE-värjäys suoritettiin Sakura Tissue-Tek®TRS™-2000 -värjäysautomaatilla. Rehydroinnin jälkeen automaatti värjäsi näytteet hematoksyliinilla ja eosiinilla, joista hematoksyliini värjää regressiivisesti ja eosiini progressiivisesti. (Liite 2.) Valitsimme HE-värjäyksen, koska se on patologian perusvärjäys ja siitä saa yleiskuvan kudoksen morfologiasta.

5.4 Näytteiden immunohistokemialliset värjäykset

Tuumorinäytteistä teimme myös immunohistokemiallisia värjäyksiä, jotta näimme miten vasta-ainevärjäykset toimivat eri tavoilla käsitellyissä näytteissä. Immunohistokemiallisia värjäyksiä varten näytteet valittiin HE-värjäyksen perusteella niin, että näytteet sisälsivät varmasti tuumorikudosta. Otimme selvää, mitä värjäyksiä patologi oli näistä tuumorinäytteistä pyytänyt ja mitä tuloksia ne olivat antaneet. Valitsimme niistä työhömmme positiivisia tuloksia antaneita värjäyksiä ja vertailun vuoksi otimme mukaan myös muutaman värjäyksen, joista oli tullut negatiivinen tulos.

Ennen immunohistokemiallisten värjäysten suorittamista laseja pidettiin yön yli lämpökaapissa (+37°C), jonka jälkeen suoritettiin parafiinin poisto Tissue-Tek®DRS™2000 värjäysautomaatilla. Näytteet rehydroitiin laskevalla alkoholisarjalla. Immunohistokemiallisista värjäyksistä teimme CD20-, CD10-, Chromogranin-A-, Cyclin D-1-, p53-, C-erbB2-, ER- ja MIB-1 -värjäykset. Esikäsittelyliuoksena näissä värjäyksissä oli puskuriliuos, joka sisälsi 10mM Tris-HCL:ää ja 1mM EDTA-puskuria (pH 9). Lasit laitettiin puskuriin ja niitä keitettiin mikroaaltouunissa (teho 900 wattia) 2 x 7 ja 2 x 5 minuuttia, jonka jälkeen niiden annettiin jäähtyä huoneenlämmössä 20 minuuttia. Lasien jäähtyttyä ne huuhdeltiin esikäsittelyliuoksen poistamiseksi PBS-liuoksella 2 x 10 minuuttia. Itse värjäys suoritettiin Labvision-värjäysautomaatilla ChemMate Envision-detektiomenetelmällä. (Kuvio 3.) Menetelmässä peroksidaasi

reagoi DAB-reagenssin kanssa, jolloin muodostui ruskea sakka. Jos kudoksessa oli antigeeni, johon käytettävä vasta-aine voi tarttua, positiivisuus näkyi ruskeana värinä. Ennen värjäystä vasta-aineet piti laimentaa ja automaattiin ohjelmoida halutut värjäykset. Vasta-aineiden valmistaja oli etukäteen määritellyt, kuinka laimeina pitoisuuksina vasta-aineita voidaan käyttää ja automaatti laski kuinka paljon mitäkin laimennosta tarvittiin. Näiden perusteella laimensimme vasta-aineet ja lisäsimme ne automaattiin. Värjäyksen loputtua tumat värjättiin käsin Mayerin hematoksyliinillä (nopea kasto) ja tehtiin dehydrointi ja lasien peittely.



KUVIO 3. Chem Mate Envision detektiomenetelmä (Kämmerer - Kapp - Gassel - Richter - Tank - Dietl - Ruck 2001: 623-630. Artikkelista modifioinut M. Kero 2006).

5.5 Näytteiden arviointi

Olimme tehneet jokaiselle arviointikohteelle oman taulukon, jossa näkyi näytenumero, kudostyyppi sekä A-, B- tai C-tunnus merkkinä näytteen käsittelytavasta. Tutkimustuloksia työssämme arvioi kaksi patologia, joista toinen katsoi HE-värjätyt lasit ja toinen immunohistokemiallisesti värjätyt lasit. Leikkautuvuutta arvioi kokenut laboratoriohoitaja. Olimme itse mukana, kun näytteitä arvioitiin. Näin pystyimme tekemään muistiinpanoja, jos näytteistä oli jotain huomautettavaa.

Työssämme arvioinnin kohteina olivat kudoksen leikkautuvuus mikrotomilla sekä erilaisten käsittelytapojen vaikutus kudoksen morfologiaan HE-värjäyksen perusteella arvioituna. Immunohistokemiallisten värjäysten avulla arvioitiin vaikuttaako erilainen

fiksaatioaine ja mikropaattouunikäsittely vasta-ainevärjäysten onnistumiseen. Tulosten tulkinnassa on otettava huomioon, että olimme itse tehneet kaikki histologisen prosessin vaiheet, eivätkä leikkeet olleet kokemattomuutemme takia riittävän tasalaatuisia.

Leikkautuvuuden arvioinnissa laboratoriohoitaja arvioi leikkaamansa blokit asteikolla 1-2 (1=hyvä, 2=huono). Hän ei tiennyt miten näytteet olivat käsitelty. Huonosti leikkautuva näyte oli joko liian kova tai liian pehmeä, jolloin siitä on vaikea saada tasaisia leikkeitä objektilasille.

Patologi arvioi näytteen käsittelyn (fiksaatio ja kudosprosessointi) onnistumista HE-värjäyksen avulla. HE-värjäyksestä arvioitiin miten näytteiden erilaiset käsittelytavat vaikuttavat kudoksen morfologiaan. Patologi katsoi lasit tietämättä, miten ne olivat käsitelty. Arvioinnissa kiinnitettiin huomiota erityisesti siihen, onko näyte fiksoitunut kunnolla ja miten kudoksen rakenteet ovat säilyneet prosessoinnin aikana. Näytteitä arvioitiin asteikolla 1-3 (1=hyvä, 2=kohtalainen ja 3=huono). (Taulukko 4.)

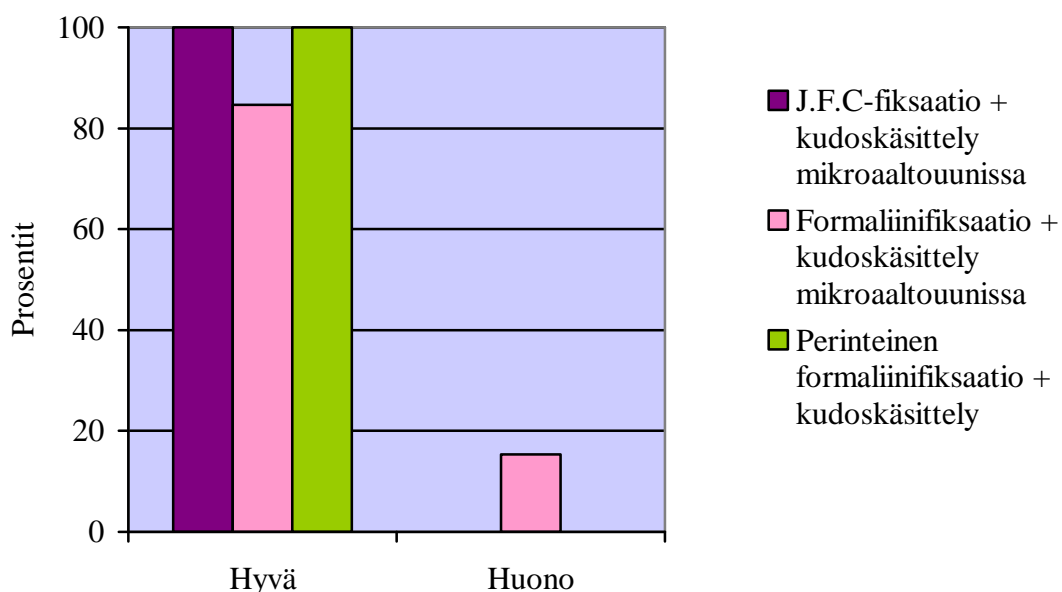
TAULUKKO 4 . Näytteiden arviointi HE-värjäyksen perusteella.

HYVÄ (1)	Näytteen käsittely onnistunut täydellisesti, jolloin morfologia erottuu selkeästi.
KOHTALAINEN (2)	Näytteen käsittely onnistunut, mutta morfologiassa hieman epäselvyyttä.
HUONO (3)	Näytteen käsittely epäonnistunut, jolloin kudusrakenteet eivät erotu selkeästi.

Immunohistokemiallisiin värjäyksiin valittiin HE-värjäyksen perusteella 6 näytettä ja jokaisesta näytteestä tehtiin 1 - 3 erilaista värjäystä. Patologi arvioi immunohistokemiallisesti värjätyt lasit asteikolla negatiivinen (-), heikko positiivinen (+) ja vahva positiivinen (++). Hän ei tiennyt miten näytteet olivat käsitelty eikä mitä tuloksia värjäykset olivat antaneet alkuperäisistä näytteistä.

6 TUTKIMUSTULOKSET

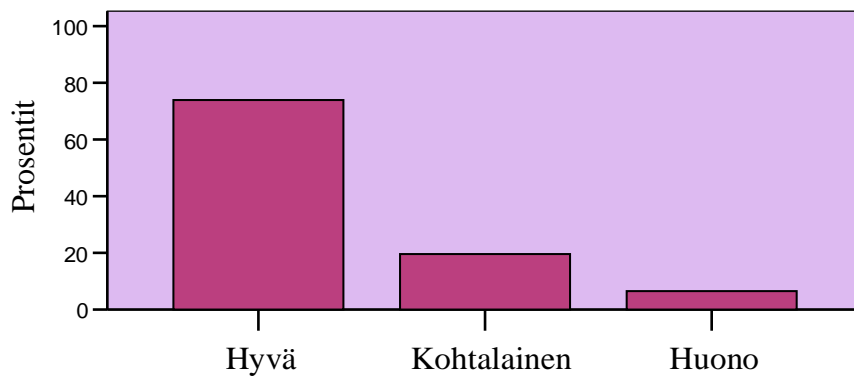
Näytteistä arvioitiin ensin leikkautuvuus. Laboratoriohoitaja leikkasi yhteensä 39 näyteblokkia ja arvioi leikkaamansa blokit asteikolla 1-2 (1=hyvä, 2=huono). Näytteistä 37 leikkautui hyvin ja vain kaksi näytettä leikkautui huonosti. (Kuvio 4.) Ne molemmat olivat samaa kudosta ja ne olivat prosessoitu sekä fiksoitu formaliinilla mikropaattolaitteissa. (Liite 3.)



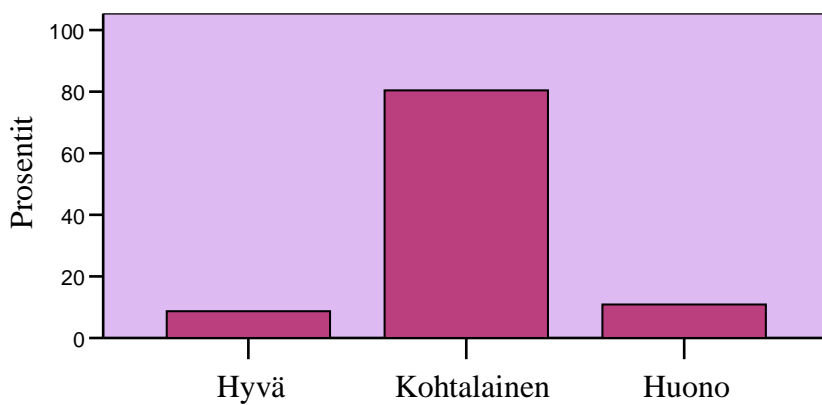
KUVIO 4. Leikkautuvuuden arviointi eritavoilla käsitellyille näytteille.

Tämän tutkimuksen perusteella voidaan päätellä, että fiksaatioaineella ja kudoksen käsittelytavalla ei näyttäisi olevan vaikutusta kudoksen leikkautuvuuteen mikrotomilla. Leikkautuvuudesta ei pystynyt laskemaan korrelaatiokerrointa, koska tulokset olivat samanlaisia.

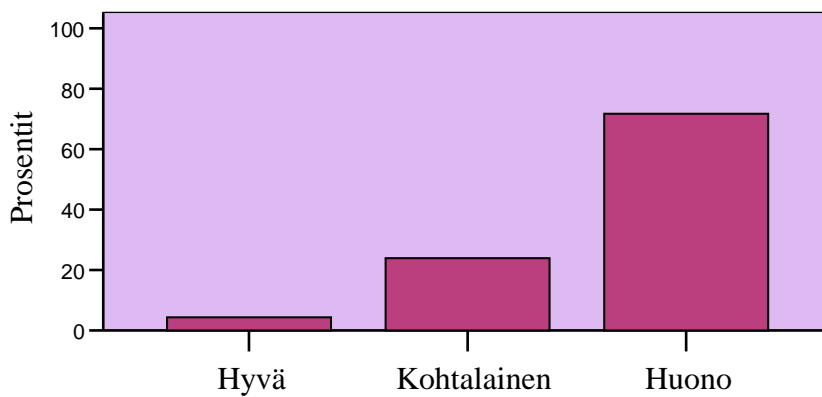
HE-värjättyjä laseja arvioitiin asteikolla 1-3 (1=hyvä, 2=kohtalainen, 3=huono). Neljä näytettä jouduttiin hylkäämään, koska leikkeet olivat niin huonolaatuisia ettei niitä pystynyt arvioimaan. (Liite 4.) Tuloksista voidaan kuitenkin päätellä, että formaliinifiksaatio huoneenlämmössä sekä perinteinen yön yli -kudosprosessointi on paras menetelmä. (Kuvio 5.) Mikropaattolaitteissa formaliinilla fiksoitu ja käsitelty näyte on lähes verrattavissa perinteiseen menetelmään. (Kuvio 6.) Näissä molemmissa käsittelytavoissa kudokset olivat fiksoituneet kokonaan ja kudorakenteet erottuivat vähintäänkin kohtalaisesti. J.F.C-fiksoitu näyte poikkesi huomattavasti edellisistä. (Kuvio 7.)



KUVIO 5. Perinteisesti formaliinifiksoitujen ja yön yli -kudosprosessoitujen näytteiden arviointi HE-värjäyksen perusteella.



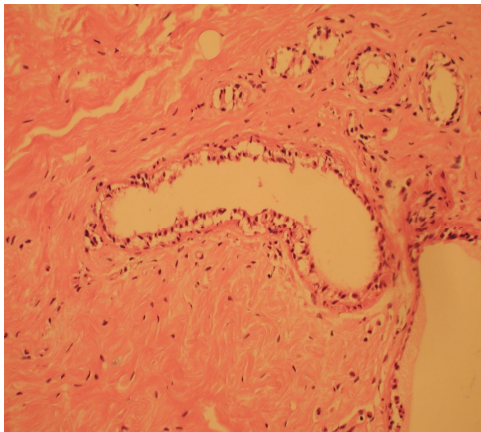
KUVIO 6. Formaliinilla mikroaaltouunissa fiksoitujen ja kudosprosessoitujen näytteiden arviointi HE-värjäyksen perusteella.



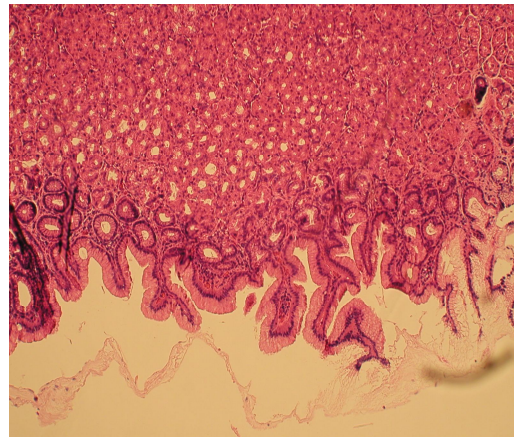
KUVIO 7. J.F.C:llä mikroaaltouunissa fiksoitujen ja prosessoitujen näytteiden arviointi HE-värjäyksen perusteella arvioituna.

Lähes kaikista J.F.C:llä fiksoiduista näytteistä oli epiteeli irronnut (kuvio 8) ja viisi näytettä oli jäänyt raa'aksi. Epiteelin irtoaminen vaikeuttaa huomattavasti diagnoosin tekemistä, koska mahdolliset muutokset näkyvät yleensä juuri epiteelissä. Mikroaaltouunilla käsitellyt näytteet värjäntyivät voimakkaammin kuin perinteisellä yön yli -menetelmällä käsitellyt näytteet. (Kuviot 9, 10.) Voimakkaampi värjäytyminen ei tuonut kudoksen eri osia tarpeeksi hyvin esille, koska värisävyjä oli vaikeampi erottaa.

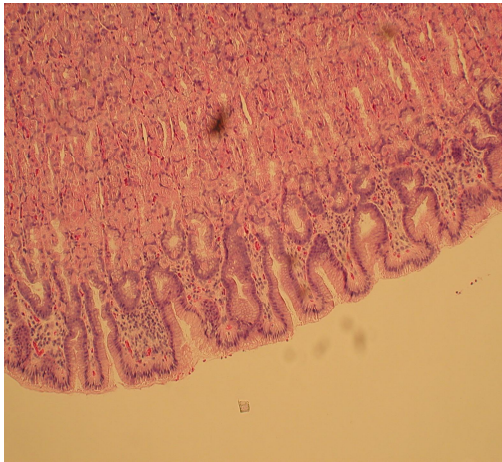
Kuvioista nähdään selvästi, että eri tavoilla käsitellyt näytteet eivät ole riippuvaisia toisistaan. Varmistimme asian laskemalla HE-värjätuille laseille Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimet, jotka olivat 0,3; 0,07 ja 0,59. Korrelaatio näytteiden välillä oli heikko ja riippuvuudet eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Testi vahvistaa sen, ettei tulosten välillä ole riippuvuutta.



KUVIO 8. J.F.C:llä mikroaaltouunissa fiksoitu näyte, kudospala rinnasta.

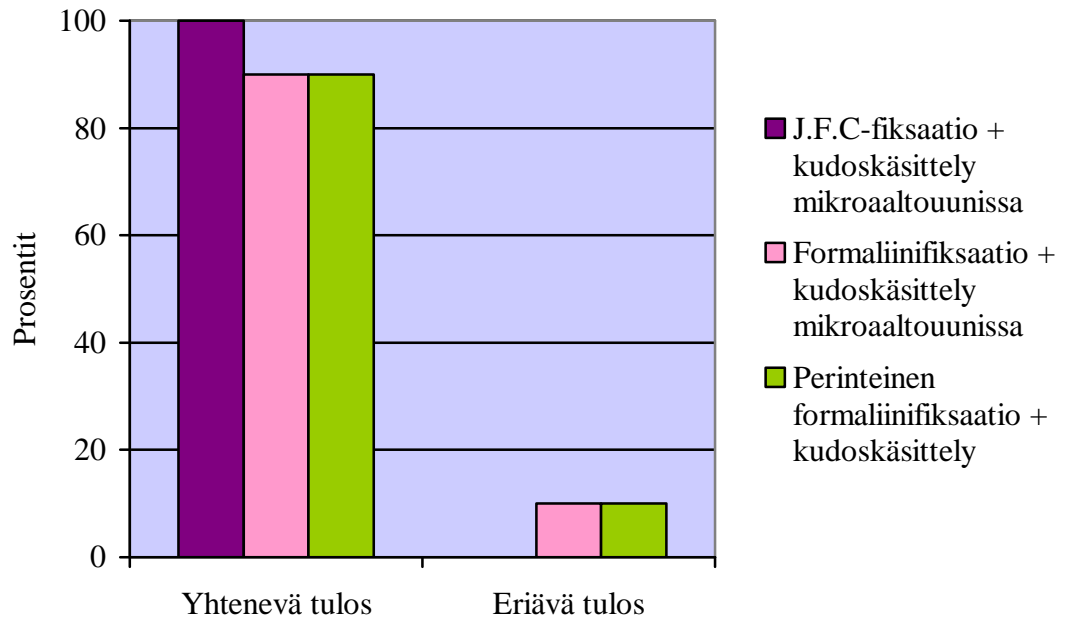


KUVIO 9. Formaliinilla mikroaaltouunissa fiksoitu näyte, kudospala mahalaukusta.



KUVIO 10. Formaliinilla
huoneenlämmössä fiksoitu näyte,
kudospala mahalaukusta.

Immunohistokemiallisiin värjäyksiin tapauksia tuli yhteensä 12, joista kaksi hylättiin huonojen leikkeiden takia. (Liite 5.) Kun näytteet oli arvioitu positiivisuuden/negatiivisuuden mukaan, vertasimme tuloksia alkuperäisiin värjäystuloksiin. Ainoastaan yhden näytteen kaksi käsittelytapaa poikkesi alkuperäisistä tuloksista. (Kuvio 11.) Laskimme tuloksista myös Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimet, jotka olivat kaikkien näytteiden välillä 0,896. Korrelaatio näytteiden välillä oli vahva, joten tuloksia voidaan pitää tilastollisesti merkitsevinä. Testin mukaan tulosten välillä on siis vahva riippuvuus. Tuloksista voidaan päätellä että fiksaatioaineella ja näytteen käsittelytavalla ei näyttäisi olevan vaikutusta immunohistokemiallisten värjäysten onnistumiseen.



KUVIO 11. Immuhistokemiallisten värjäysten tulokset verrattuna aiempiin tuloksiin.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Tämän tutkimuksen perusteella mikroaaltouuni näyttäisi olevan hyvä menetelmä nopeuttaa histologisen näytteen käsittelyä. Formaliinilla mikroaaltouunissa fiksoidut ja sen jälkeen mikroaaltouunissa kudosprosessoidut näytteet olivat lähes verrattavissa perinteiseen menetelmään. Vaikka tulokset olivat usein kohtalaisia, ne olivat kuitenkin lähempänä hyvää kuin huonoa. Mikroaaltouunin käyttöä fiksaatiossa ja kudosprosessoinnissa on tutkittu aikaisemminkin ja tulokset ovat olleet lupaavia. Tämä tutkimus ei muuttanut ajatusta siitä, että mikroaaltouunin voisi ottaa myös rutiinikäyttöön nopeuttamaan vastauksen saamista patologian laboratoriosta.

Mikroaaltouunitekniikka on uusi menetelmä ja parhaan tuloksen saamiseksi tarvittaisiin enemmän tietoa mikroaaltouunin soveltuvuudesta eri kudoksille. Tutkimus olisi luotettavampi, jos kokeiltaisiin mikroaaltouunin sopivuutta vain yhdelle kudostyypille kerrallaan, koska aineiden imeytymisessä eri kudoksiin on eroja. Koska tutkimuksen empiirisen osuuden aika oli lyhyt ja näytteitä oli saatavilla niukasti, saimme otoskokoa suuremmaksi käyttämällä useita eri kudoksia. Tutkimustuloksia voidaan kuitenkin pitää suuntaa antavina.

Tutkimuksemme perusteella fiksaatioaineella ja kudokäsittelytavalla ei näyttäisi olevan vaikutusta kudoksen leikkautuvuuteen mikrotomilla. Oletimme, että J.F.C:llä ja formaliinilla fiksoitujen näytteiden leikkautuvuudessa olisi ollut huomattava ero, koska ajattelimme, että J.F.C alkoholipohjaisena aineena kovettaisi kudosta. Tutkimustulos olisi ollut luotettavampi, jos leikkautuvuutta olisi arvioinut useampi kuin yksi laboratoriohoitaja ja leikattavia blokkeja olisi ollut enemmän. Koska vain kaksi näytettä leikkautui huonosti, niin todennäköisesti huono leikkautuvuus johtui kudoksesta eikä käsittelytavasta, koska kaikki muut samalla tavalla käsitellyt näytteet leikkautuivat hyvin.

HE-värjättyjen lasien arviointiin vaikutti leikkeiden huono tekninen laatu. Omasta kokemattomuudestamme johtuen virheitä tapahtui jo makroleikkelyssä sekä mikrotomilla leikkaamisessa. Neljä näytettä jouduttiin kokonaan hylkäämään, koska leikkeet olivat erittäin ryppyisiä tai makroleikkelyssä pala oli leikattu väärin, jolloin arviointi oli mahdotonta. HE-tulosten arviointiin on saattanut vaikuttaa myös se, että patologit ovat tottuneet katsomaan formaliinilla fiksoituja ja yön yli prosessoituja näytteitä, jotka ovat hieman vaaleampia kuin mikroaaltouunilla käsitellyt. HE-värjättyjä laseja arvioi yksi patologi. Tulos olisi ollut luotettavampi, jos näytteitä olisi arvioinut useampi asiantuntija. HE-värjäyksen tuloksista näki kuitenkin selvästi, että J.F.C ei sovellu fiksaatioaineeksi. J.F.C jätti osan kudoksista raaoksiksi ja todennäköisesti sen sisältämä alkoholi oli kutistanut kudosta, jonka seurauksena epiteeli oli irronnut. Kaupallisia reagensseja on nykyään saatavilla useita erilaisia ja niiden toimivuutta fiksaatioaineina kannattaisi tutkia lisää.

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä tulokset eivät juurikaan poikenneet alkuperäisistä tuloksista. Meillä ei ollut kontrolleja mukana värjäyksissä, joten jos tulokset olisivat poikenneet alkuperäisistä, emme olisi tiedäneet johtuuko se kudoksen käsittelytavasta vai värjäyksen epäonnistumisesta. Tajusimme tämän asian vasta, kun värjäykset olivat jo tehty. Tästä virheestä sekä pienestä otoskoosta johtuen tuloksia ei voida pitää luotettavina, vaikka saimmekin lähes samat tulokset kuin alkuperäisistä näytteistä.

Teimme työssämme itse kaikki histologisen prosessin vaiheet. Vaikka kokemattomuutemme näkyy työn lopputuloksessa, pidämme sitä kuitenkin tärkeänä, että teoriatietojen lisääntyessä saimme myös harjoitella kädentaitoja.

Immunohistokemia tuli meille kaikille uutena asiana ja värjäysten suorittaminen olisikin vaatinut enemmän harjoittelua. Jokainen ryhmämme jäsen osallistui kaikkien työvaiheiden tekemiseen. Tutkimus olisi ollut luotettavampi, jos yksi henkilö olisi tehnyt aina yhden työvaiheen kokonaan. Halusimme kuitenkin oman oppimisemme kannalta osallistua jokaiseen vaiheeseen.

LÄHTEET

Anderson, Graeme – Bancroft, John 2002: Tissue Processing and Microtomy including frozen. Teoksessa Bancroft, John D. – Gamble, Marilyn (ED.): Theory and Practise of Histological Techniques. Fifth Edition. London: Churchill Livingstone, 85-107.

Aho, Heikki 1989: Histologiset menetelmät patologiassa. Turku: Turun yliopiston kliinis- teoreettinen laitos.

Bjålie, Jan G. – Haug, Egil – Sand, Olav – Sjaastad, Øystein V. – Toverud, Kari C. 2000: Ihminen, fysiologia ja anatomia. Toinen painos. Helsinki: WSOY.

Boon, Mathilde – Kok, L.P. 1987: Microwave Cookbook of Pathology, the Art of Microscopic Visualization. Leiden: Coulomb Press Leiden.

Dabbs, David 2006: Diagnostic immunohistochemistry. Toinen painos.

Ellis, Ian 2002: Immunocytochemistry in Breast Pathology. Teoksessa Bancroft, John – Gamble, Marilyn (ED.): Theory and Practise of Histological Techniques. Fifth Edition. London: Churchill Livingstone, 499-516.

Hopwood, David 2002: Fixation and Fixatives. Teoksessa Bancroft, John – Gamble, Marilyn (ED.): Theory and Practise of Histological Techniques. Fifth Edition. London: Churchill Livingstone, 63-84.

Huhtakallio, Jari 1995: Patologian perusteet ja menetelmät. Oulu: Oulun Liikekirjapaino.

Krenacs, Laszlo - Bagdi, Eniko - Krenacs, Tribor 2002: Immunocytopathology of Lymphomas. Teoksessa Bancroft, John – Gamble, Marilyn (ED.): Theory and Practise of Histological Techniques. Fifth Edition. London: Churchill Livingstone, 517-535.

Kämmerer U. - Kapp M. - Gassel A.M. - Richter T. - Tank C. - Dietl J. - Ruck P. A 2001: New Rapid Immunohistochemical Staining technique Using the EnVision Antibody Complex. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 49 (5). 623-630

Leong, Anthony S-Y 1994: Fixation and Fixatives. Teoksessa Woods, Anthony E. - Ellis, Roy C. (ED.): Laboratory Histopathology, a Complete Reference. Volume 1. Edinburgh, Hongkong, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo: Churchill Livingstone.

Milestone Microwave Laboratory Systems 2005: RHS-1 and RHS-2 Microwave Vacuum Histoprocessor. Instruction Manual: Operation Manual, Application Notes.

Morales, Azorides R – Nassiri, Mehdi – Kanhoush, Rima – Vincek, Vladimir – Nadji, Mehrdad 2004: Experience With Automated Microwave-Assisted Rapid Tissue Processing Method. Anatomic Pathology 121: 528 – 536.

Myhre, Eivind 1993: Patologia. Keuruu: Kustannusosakeyhtiö Otavan painolaitokset.

Naukkarinen, Anita 2000: Histologiset värjäykset. Moodi 4-5/2000. 153-158.

Naukkarinen, Anita (toim.) 2005: Immunohistokemian peruskurssi. Kurssimoniste. 3.painos.

Naukkarinen, Anita - von Boguslawsky, Kristina 1998: Immunohistokemia. Teoksessa Rantala, Immo - Lounatmaa, Kari (toim.) 1998: Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino. 133-157.

Rantala, Immo - Laasonen, Antero 2000: Immunohistokemialliset värjäykset. Moodi 4-5/2000. 148-152.

Rantala, Immo - Naukkarinen, Anita - Helin, Heikki 1998: Histologia. Teoksessa Rantala, Immo - Lounatmaa, Kari (toim.) 1998: Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino.

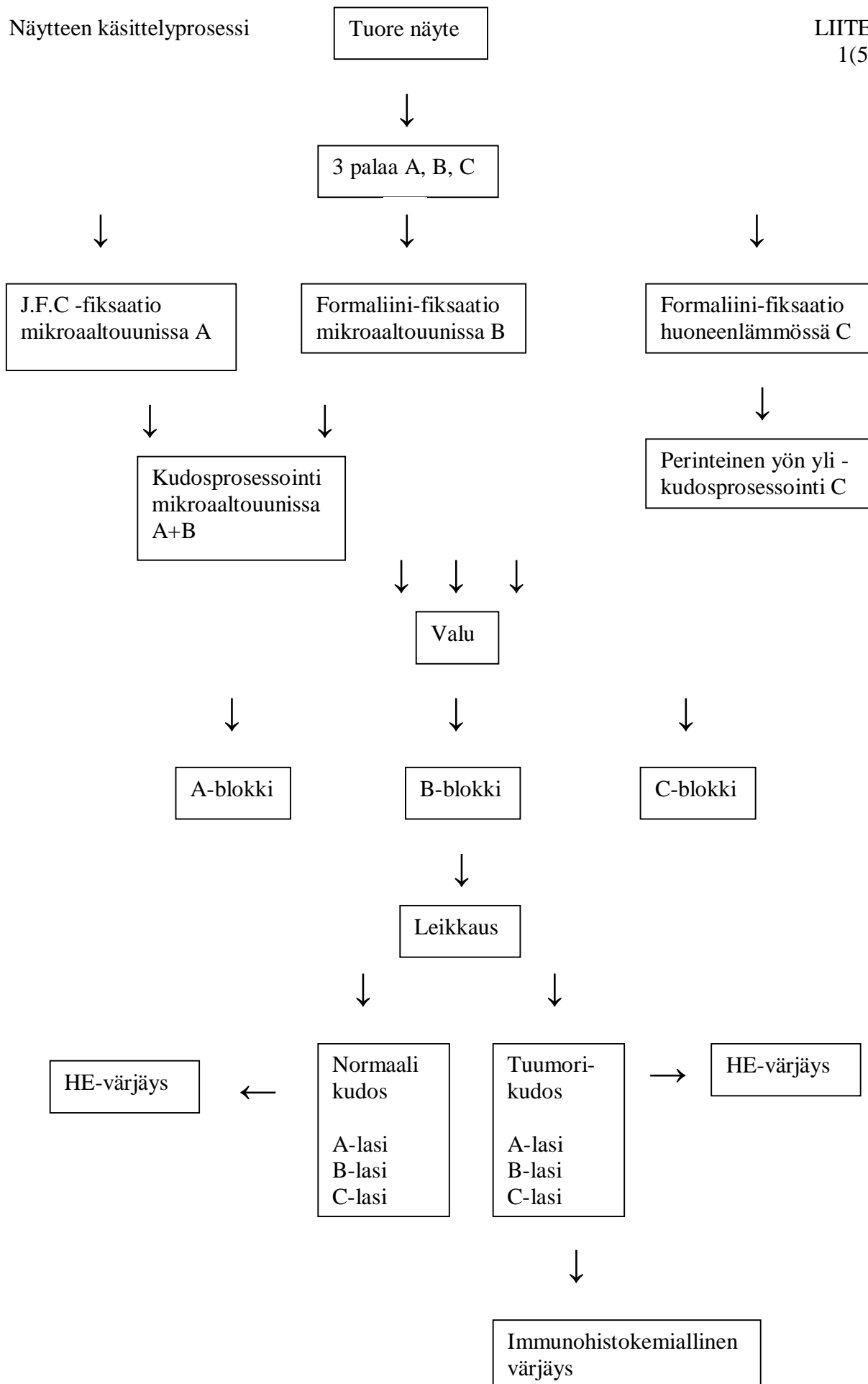
Slap, Steven 2002: Application of microwave technology to histology. Teoksessa Bancroft, John – Gamble, Marilyn (ED.): Theory and Practise of Histological Techniques. Fifth Edition. London: Churchill Livingstone, 415-420.

Srinivasan, Mythily - Sedmak, Daniel - Jewell, Scott 2002: Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. American Journal of Pathology 161 (6). 1961-1971.

The Internet Pathology Laboratory for Medical Education 1994-2006: Histotechniques. Verkkodokumentti.
<<http://medlib.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTO.html>>Luettu 10.1.2007.

Vision Biosystems: Novocastra Reagents: Primary antibodies for IHC. Verkkodokumentti. <www.vision-bio.com> Luettu: 30.3.2007.

Willis, Donna – Minshew, Jan 2002: Microwave Technology in the Histology Laboratory. Histologic – Technical Bulletin for Histotechnology No.1. 1-5.



LIITE 2

2(5)

Hematoksyliini-eosiini-värjäys

1) Kuivausase	5 minuuttia
2) Ksyleeni	4 minuuttia
3) Ksyleeni	4 minuuttia
4) Absoluuttinen etanoli	2 minuuttia
5) Absoluuttinen etanoli	1 minuuttia
6) 96 % etanoli	30 sekuntia
7) 96 % etanoli	1 minuuttia
8) 50 % etanoli	30 sekuntia
9) Aqua	20 sekuntia
10) Mayerin hematoksyliini	6 minuuttia 30
sekuntia	
11) Juokseva vesi	5 minuuttia
12) HCL-diffenroituminen	26 sekuntia
13) Juokseva vesi	10 minuuttia
14) Eosiini	2 minuuttia
15) 96 % etanoli	6 sekuntia
16) 96 % etanoli	10 sekuntia
17) Absoluuttinen etanoli	30 sekuntia
18) Absoluuttinen etanoli	30 sekuntia
19) Absoluuttinen etanoli	30 sekuntia
20) Ksyleeni	30 sekuntia
21) Ksyleeni	30 sekuntia
22) Ksyleeni	30 sekuntia

(Patologian keskuslaboratorion HE-värjäys -ohje)

NÄYTENUMERO	KUDOS	KÄSITTELYTAPA	ARVIO	HUOM.
2676	paksusuoli	A	1	
		B	1	
		C	1	
2532	keuhko	A	1	
		B	1	
		C	1	
		A	1	
		B	1	
		C	1	
2273	kitarisa	A	1	
		B	1	
		C	1	
2143	virtsarakko	A	1	
		B	1	
		C	1	
2130	rinta	A	1	
		B	1	
		C	1	
		A	1	
		B	1	
		C	1	
		A	1	
		B	1	
		C	1	
		A	1	
		B	1	
		C	1	
		A	1	
		B	1	
		C	1	
3113	keuhko	A	1	kova
		B	2	
		C	1	
		A	1	
		B	1	
		C	1	
		A	1	
		B	1	
		C	1	
		A	1	
		B	1	kova
		C	1	
		A	1	
		B	2	
		C	1	

Näytteen käsittelytapa:

A = J.F.C-fiksaatio + kuduskäsittely mikroaaltouunissa

B = formaliinifiksaatio + kuduskäsittely mikroaaltouunissa

C = formaliinifiksaatio huoneenlämmössä + yön yli -kudosprosessointi

Tulosten arviointiasteikko: 1 = hyvä, 2 = huono

NÄYTENUMERO	KUDOS	KÄSITTELYTAPA	TULOS	HUOM.
2532	keuhko	A	1	
		B	1	
		C	1	
3113	keuhko	A	2	
		B	2	
		C	2	
		A	1	
		B	2	
		C	2	
3108	istukka	A	3	palat vaihtelee
		B	2	
		C	1	
		A	3	RAAKA
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
2130	rinta	A	3	
		B	1	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	2	
		B	3	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
2144	perna	A	2	RAAKA

		B	3	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	2	
		B	2	
		C	1	
		A	2	
		B	2	
		C	1	
2273	tonsilla	A	3	
		B	2	
		C	1	
2678	paksusuoli	A	3	limakalvo irti
		B	2	
		C	1	
2535	mahalaukku	A	3	tasaisen punainen
		B	2	
		C	1	
2276	kilpirauhanen	A	2	epiteeli irti
		B	1	
		C	1	
		A	3	epiteeli irti
		B	1	
		C	1	
		A	2	
		B	2	
		C	1	
2558	rinta	A	3	epiteeli irti
		B	2	
		C	2	
2854	imusolmuke tuumori	A	3	raaka
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	3	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	3	
		C	1	
		A	3	

		B	2	
		C	1	
2007	lisämunuainen	A	2	
		B	2	
		C	2	
		A	2	
		B	2	
		C	3	
		A	2	
		B	2	
		C	3	
		A	2	
		B	2	
		C	2	
2558	rintatuumori	A	3	
		B	2	
		C	2	
2672	imusolmuke tuumori	A	3	
		B	2	
		C	3	
2557	rintatuumori	A	3	
		B	2	
		C	1	
4673	peräsuoli tuumori	A	3	
		B	2	
		C	1	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
2679	peräsuoli tuumori	A	3	
		B	3	
		C	2	
		A	3	
		B	2	
		C	1	
2434	imusolmuke tuumori	A	3	
		B	2	
		C	2	
2143	virtsarakko	A	HYLÄTTY	huono leike
		B	HYLÄTTY	huono leike
		C	HYLÄTTY	huono leike
2674	paksusuoli	A	HYLÄTTY	huono leike
		B	HYLÄTTY	huono leike
		C	HYLÄTTY	huono leike
2532	keuhko	A	HYLÄTTY	huono leike
		B	HYLÄTTY	huono leike
		C	HYLÄTTY	huono leike
3113	keuhko	A	HYLÄTTY	huono leike

B	HYLÄTTY	huono leike
C	HYLÄTTY	huono leike
A	3	
B	2	
C	2	

Näytteen käsittelytapa:

A = J.F.C-fiksaatio + kuduskäsittely mikroaaltouunissa

B = formaliinifiksaatio + kuduskäsittely mikroaaltouunissa

C = formaliinifiksaatio huoneenlämmössä + yön yli -kudosprosessointi

Tulosten arviointiasteikko:

1 = hyvä

2 = kohtalainen

3 = huono

LIITE 5

Immunohistokemiallisten värjäysten arviointi

5(5)

NÄYTENRO	KUDOS	VÄRJÄYS	KÄSITTELY	ARVIO	HUOM.
2854	imusolmuke	CD20	A	+	
			B	+	
			C	+	
		MIB-1	A	++	
			B	++	
			C	++	
2434	imusolmuke	CD20	A	++	
			B	++	
			C	++	
	imusolmuke	Cyclin D-1	A	HYLÄTTY	huono leike
			B	HYLÄTTY	huono leike
			C	HYLÄTTY	huono leike
2558	rinta	ER	A	+	
			B	+	

			C	+	
		C-erbB-2	A	neg	
			B	neg	
			C	neg	
		MIB-1	A	HYLÄTTY	huono leike
			B	HYLÄTTY	huono leike
			C	HYLÄTTY	huono leike
2557	rinta	C-erbB-2	A	neg	
			B	+	eriävä tulos
			C	+	eriävä tulos
		ER	A	+	
			B	+	
			C	+	
2007	lisämunuainen	ChromograninA	A	+	raaka
			B	+	raaka
			C	+	
		p53	A	neg	
			B	neg	
			C	neg	
2672	imusolmuke	CD10	A	+	
			B	+	
			C	+	

Näytteen käsittelytapa:

A = J.F.C-fiksaatio + kuduskäsittely mikroaaltouunissa

B = formaliinifiksaatio + kuduskäsittely mikroaaltouunissa

C = formaliinifiksaatio huoneenlämmössä + yön yli -kudosprosessointi

Tulosten arviointiasteikko:

neg = negatiivinen

+ = heikko positiivinen

++ = vahva positiivinen